

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Květa Trávníčková

Evoluce regulačních mechanismů aktivace EGF receptoru
Evolution of regulatory mechanisms of EGF receptor activation

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Kvido Strišovský, PhD.

Praha, 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11.5.2017

Podpis

Poděkování

Na prvním místě děkuji doktoru Stříšovskému za to, že pro mou bakalářskou práci vymyslel tak skvělé téma, že se mnou byl trpělivý a vracel mi chuť pokračovat v psaní pokaždé, kdy mne již síly opouštěly. Dále děkuji své rodině, přátelům a známým za jejich shovívavost a podporu.

Abstrakt

Signalisace prostřednictvím EGF receptoru je klíčová pro správný průběh ontogenetického vývoje i udržování homeostasy v tělech organismů. Jsou skrze ni regulovány procesy jako proliferace, migrace či diferenciace buněk. Na příkladu tří dobře probádaných organismů, *C. elegans*, *D. melanogaster* a *H. sapiens sapiens*, jsou v této práci vyloženy principy regulace EGF receptoru a na jejich základě poté vyvozeny trendy, které se při jejich evoluci uplatnily. Zvláštní pozornost je přitom věnována proteinům z rodiny rhomboidů, jejichž činnost je se signalisací EGF receptoru pevně spjata. Narušení regulace EGF receptoru významně přispívá k projevům některých onemocnění, předně mnohých typů rakovin, ale také schizofrenie, lupénky a kardiovaskulárních chorob. Proto mají výsledky výzkumu na tomto poli potenciál uplatnit se při vývoji nových léčebných prostředků.

Klíčová slova: EGF receptor, regulační mechanismy, evoluční trendy, signální transdukce, dimerisace, odštěpování ektodomény, rhomboid, endocytosa, autofosforylace, tyrosinkinasa

Abstract

Signalling through EGF receptor is crucial both for ontogenesis and for maintaining homeostasis in adult organisms. It is involved in controlling cellular behaviours such as proliferation, migration or differentiation. This thesis provides an insight into evolution of the regulatory mechanisms of EGF receptor activation by discussing their principles in *C. elegans*, *D. melanogaster* and *H. sapiens sapiens*, on the basis of which conclusions about their evolutionary tendencies are made. Attention is focused on the roles of the rhomboid family of proteins, whose activity is tightly associated with EGF receptor signalling. Dysregulation of the EGF receptor unnegligibly contributes to the development of various diseases, mainly many types of cancer, but also schizophrenia, psoriasis and cardiovascular disorders. Experimental results obtained on this field of research therefore have the potential to be applied in drug design.

Keywords: EGF receptor, regulatory mechanisms, evolutionary trends, signal transduction, dimerisation, ectodomain shedding, rhomboid, endocytosis, autophosphorylation, tyrosin kinase

Seznam použitých zkratek

ADAM	A disintegrin and metalloprotease, membránová proteasa štěpící např. prekursory ligandů EGF receptoru
AGEF	Arf-1 guanine nucleotide exchange factor, protein měnící GDP za GTP
Akt	serin/threoninová kinasa, protein signální transdukce
AP-1	protein důležitý pro transport z trans-Golgi aparátu
Arf GTPasa	ADP-ribosylation factor GTPasa, protein důležitý pro transport váčků
ATP	adenosintrifosfát
BMP	Bone morphogenetic protein, serin/threoninkinasový receptor
bp	base pair(s), pár(ů) basí
c-Fos	FBJ osteosarcoma oncogene, transkripční faktor
c-Myc	transkripční faktor
Cbl	Casitas B-lineage lymphoma, E3 podjednotka ubikvitinligasy
cDNA	komplementární deoxyribonukleotidová kyselina (vzniká reversní transkripcí mRNA)
CR doména	cysteine-rich (na cystein bohatá) doména
DER	<i>Drosophila</i> EGF receptor, EGF receptor u octomilky
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
Drk	Downstream of receptor kinase, protein signální transdukce
EGF	epidermal growth factor, epidermální růstový faktor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
egl-1	Egg-laying defective 1, gen pro protein spouštějící apoptosu
Elk	transkripční faktor
Eps-8	Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8, protein signální transdukce vážící se na EGFR
ER	endoplasmatické retikulum
ERAD	ER-associated degradation, degradace asociovaná s ER
ErbB	erythroblastosis oncogene B, lidský EGF receptor
Erm-1	Ezrin/Radixin/Moesin 1, protein propojující plasmatickou membránu s aktinovým cytoskeletem
FGF	fibroblast growth factor, fibroblastový růstový faktor
FGFR	fibroblast growth factor receptor, receptor pro fibroblastový růstový faktor
GA	Golgiho aparát
Gap-1	GTPase-activating protein 1, protein aktivující Ras GTPasu
GPCR	G-protein coupled receptor, receptor spřažený s G-proteiny
GTP	guanosintrifosfát
GTPasa	guanosintrifosfatasa

HLH-2	Helix-loop-helix 2, transkripční faktor
Hox-protein	produkt Hox (homeobox) genu, protein podílející se na ustavení tělního plánu organismu
CHIP	chaperone-interacting protein, ubikvitinligasa
Ig	imunoglobulin, imunoglobulinový
Jak	Janusova kinasa, protein signální transdukce
kb	kilobase
Let-23	Lethal-23, EGF receptor u <i>C. elegans</i>
LIN-3	homolog epidermálního růstového faktoru u <i>C. elegans</i>
LRR	leucin-rich repeat, na leucin bohatý motiv
MAP kinasa	mitogen-activated protein kinase
MBV	multivesicular body, vnitrobuněčný váček, z jehož membrány se do jeho lumen odškrcují váčky obsahující materiál určený k degradaci
mRNA	messenger RNA, mediátorová RNA
NFκB	nuclear factor kappa B, regulátor transkripce
NHR	nuclear hormone receptor
NHR	nuclear hormone receptor, jaderný receptor pro hormony
p21	inhibitor cyklin dependentních kinas
PDZ doména	PSD-95, Discs large and Zona occludens 1, doména vážící se na fosforylované tyrosinové zbytky
PI-3	fosfoinositid
PKB	proteinkinasa B
PLC-γ	fosfolipasa C gama
PRR	proline-rich region, oblast bohatá na prolin
PTB doména	phosphotyrosine binding, fosfotyrosin vazebná
Rab-5/7	GTPasa zajišťující transport váčků
Ras	Rat sarcoma, GTPasa aktivující MAP kinasovou kaskádu
RHBDL-2	Rhomboid-like 2, lidská intramembránová proteasa z rodiny rhomboidů
RNA	ribonukleotidová kyselina
ROM-1	Rhomboid 1, intramembránová proteasa z rodiny rhomboidů
SH2 doména	Src homology 2, doména vážící se na fosforylované tyrosinové zbytky
SL1	splice leader 1
Sli-1	Suppressor of lineage defect, E3 podjednotka ubikvitinligasy u <i>C. elegans</i>
Src	nereceptorová tyrosinkinasa, protein signální transdukce
STAT	signal transducer and activator of transcription; protein signální transdukce
SWI/SNF	chromatin remodelující komplex
TGFα/β	transforming growth factor α/β, transformující růstový faktor α/β
TMPS	triple membrane-passing signal, signál třikrát procházející přes membránu

UTR	untranslated region, úsek mRNA, jenž není translatován
VPC	vulva precursor cell, buňka, která dává vznik vulvě

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	vi
1 Úvod.....	1
1.1 Co je EGF receptor?.....	1
1.2 Struktura EGF receptoru.....	1
1.3 Mechanismus aktivace EGF receptoru.....	2
1.4 Důsledky aktivace EGF receptoru.....	2
1.5 Cíl této bakalářské práce.....	3
2 <i>Caenorhabditis elegans</i>.....	4
2.1 Úvod.....	4
2.2 Transkripční regulace Let-23 signalisace.....	5
2.3 Regulace alternativním sestřihem receptoru.....	5
2.4 Regulace lokalisací receptoru.....	5
2.5 Regulace vazbou ligandu.....	6
2.6 Regulace alternativním sestřihem ligandu.....	6
2.7 Regulace dostupností receptoru.....	7
2.8 Regulace dostupností ligandu.....	7
2.9 Regulace fosforylací tyrosinových zbytků.....	8
3 <i>Drosophila melanogaster</i>.....	9
3.1 Úvod.....	9
3.2 Transkripční regulace DER signalisace.....	9
3.3 Regulace alternativním sestřihem receptoru.....	9
3.4 Regulace vazbou ligandu.....	9
3.4.1 <i>Spitz</i>	10
3.4.2 <i>Keren</i>	11
3.4.3 <i>Gurken</i>	11
3.4.4 <i>Vein</i>	12
3.5 Regulace negativní zpětnou vazbou.....	12
3.6 Regulace dostupností receptoru.....	14
3.7 Regulace dostupností ligandu.....	14
4 <i>Homo sapiens sapiens</i>.....	15
4.1 Diversita lidských EGF receptorů.....	15
4.2 Biologické efekty aktivace EGF receptorů.....	16
4.3 Transkripční regulace EGFR signalisace.....	16
4.4 Regulace alternativním sestřihem receptorů.....	17
4.5 Regulace vazbou ligandu.....	18
4.5.1 <i>Epidermální růstový faktor (EGF)</i>	19
4.5.2 <i>Transformující růstový faktor α (TGFα)</i>	19

4.5.3 Heparin vážící EGF (HB-EGF).....	20
4.5.4 Amphiregulin.....	20
4.5.5 Betacellulin.....	20
4.5.6 Epiregulin.....	20
4.5.7 Epigen.....	20
4.5.8 Neureguliny.....	21
4.6 Regulace alternativním sestřihem ligandu.....	21
4.7 Regulace dostupností ligandu.....	21
4.8 Regulace dimerisací.....	22
4.9 Regulace dostupností receptoru.....	22
4.10 Regulace skrz ostatní signální kaskády.....	23
4.11 Regulace odštěpováním ektodomény receptoru.....	24
4.12 Regulace fosforylací tyrosinových zbytků.....	24
4.13 Onemocnění způsobená dysregulací ErbB receptorů.....	25
4.14 Léčebné prostředky používané v boji proti onemocněním souvisejícím s ErbB receptory.....	26
5 Závěr.....	27
6 Seznam použité literatury.....	28

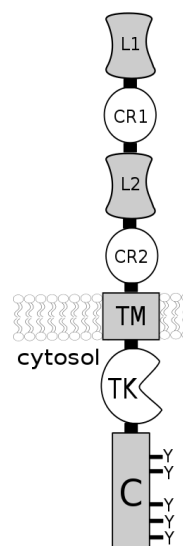
1 Úvod

1.1 Co je EGF receptor?

Receptor pro epidermální růstový faktor (dále EGF receptor¹) je transmembránový protein patřící do skupiny receptorů s vlastní tyrosinkinasovou aktivitou (S. Cohen *et al.*, 1982). Je přítomen u organismů napříč fylogenetickým spektrem, nevylučuje oblíbené modelové organismy (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* či *Mus musculus*) ani moderního člověka (*Homo sapiens sapiens*) (Aroian *et al.*, 1990; Cohen *et al.*, 1980; S. Cohen *et al.*, 1982; Livneh *et al.*, 1985). Jeho cílovou destinací v rámci buňky je plasmatická membrána, kde plní roli sensoru signálů z vnějšího prostředí a spouštěče adekvátních odpovědí uvnitř buňky (Cohen *et al.*, 1980).

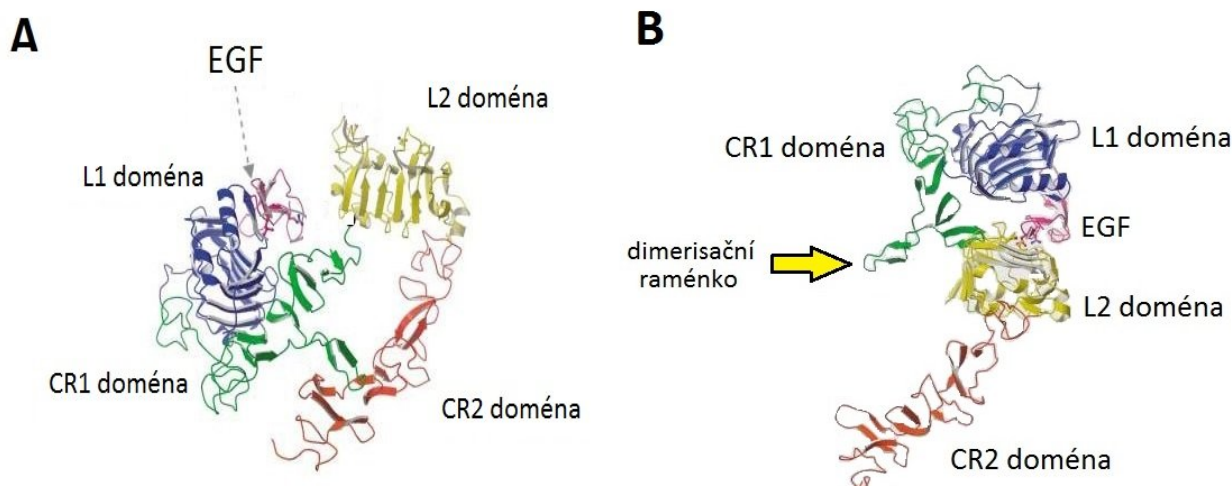
1.2 Struktura EGF receptoru

EGF receptor je transmembránový protein typu I (Ullrich *et al.*, 1984). Lipidovou dvojvrstvou tedy prostupuje pouze jednou, jsa svým C-koncem orientován do cytosolu (obr. 1). Jeho extracelulární část obsahuje dvě domény bohaté na cystein (CR domény) uplatňující se jak při zachování neaktivní konformace, tak při tvorbě dimerů po aktivaci receptoru (Aroian *et al.*, 1990; Ferguson *et al.*, 2003; Jorissen *et al.*, 2000). Zbylé dvě domény extracelulární části – pro obsah leucinových motivů zvané L1 a L2 – tvoří vazebné místo pro ligand (Ogiso *et al.*, 2002), jsouce od sebe v neaktivním stavu oddáleny díky interakci CR domén (Ferguson *et al.*, 2003) (obr. 2). Za transmembránovým α -helixem (Mineev *et al.*, 2010) následuje konservovaná tyrosinkinasová doména (Ullrich *et al.*, 1984) a variabilní C-koncová část s tyrosiny podstupujícími fosforylaci (Margolis *et al.*, 1989).



Obr. 1: Schéma struktury EGF receptoru. L, na leucin bohaté domény; CR, na cystein bohaté domény; TM, transmembránová doména; TK, tyrosinkinasová doména; C, C-koncová doména obsahující fosforylovatelné tyrosiny (Y; jejich počet na obrázku neodpovídá skutečnosti). Překresleno podle Wells, 1999.

1 *Poznámka:* V odborné literatuře je pojem „EGF receptor“ užíván jednak ve smyslu obecném, tedy pro označení receptoru aktivovatelného ligandem s EGF-like doménou, druhak pro označení molekuly ErbB1, jednoho ze čtyř EGF receptorů přítomných u savců. Za účelem vyhnout se nejednoznačnosti je v této bakalářské práci termín EGF receptor (EGFR) vždy míněn *sensu lato*.



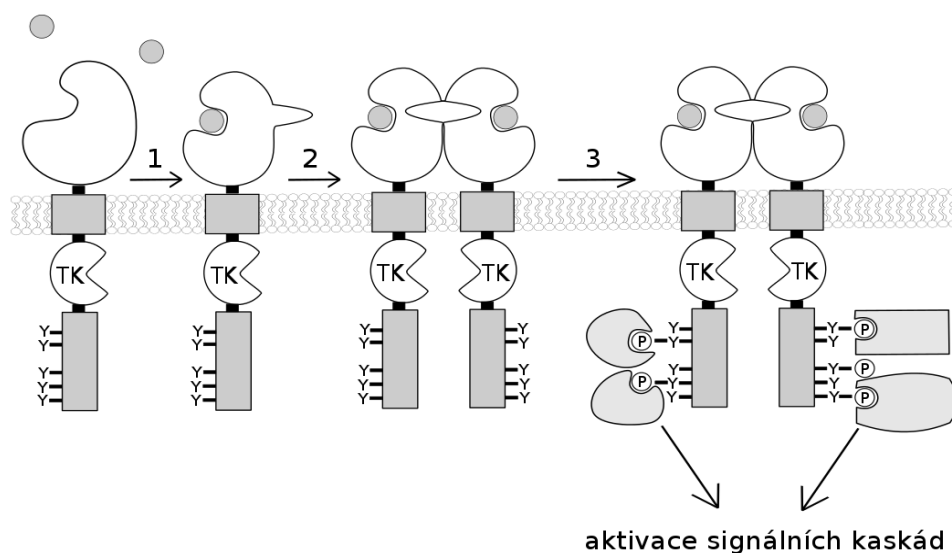
Obr. 2: Struktura extracelulární části EGFR v neaktivní (A) a aktivní (B) konformaci. Upraveno podle Ferguson *et al.*, 2003.

1.3 Mechanismus aktivace EGF receptoru

Poté, co se do vazebného místa mezi doménami L1 a L2 naváže ligand, dojde k přerušení interakcí CR domén držících receptor v neaktivním stavu a k vytržení „dimerizačního raménka“, jež umožní vytvoření dimeru s jiným párem EGF receptor-ligand (obr. 3) (Ferguson *et al.*, 2003). Následuje vzájemná fosforylace tyrosinových zbytků v C-koncových doménách obou receptorů, která vede ke zvýšení kinasové aktivity receptoru (Bertics a Gill, 1985) a k vytvoření vazebných míst pro proteiny signální transdukce. Ty se na cytosolickou část receptoru váží svými SH2, PTB či PDZ doménami (Anderson *et al.*, 1990; Kaech *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 1993). Odlišnost od signalisace skrz ostatní tyrosinkinasové receptory, např. insulinový receptor, tkví v tom, že k vytvoření dimeru EGF receptorů může dojít až po navázání molekuly ligandu na každý z dimerizačních partnerů, neboť ligand se vazebných interakcí s protějškem „svého“ receptoru vůbec neúčastní (Garrett *et al.*, 2002; Ogiso *et al.*, 2002).

1.4 Důsledky aktivace EGF receptoru

Aktivovaný EGF receptor většinou spouští Ras/MAP kinasovou dráhu, jejímž vyústěním je posílení exprese jaderných genů vedoucí k překonání kontrolních bodů buněčného cyklu a tedy k buněčnému dělení, např. transkripčního aktivátoru *c-myc* nebo cyklinu E (Z. Li *et al.*, 2015). Jiné dráhy signální transdukce EGF receptorem spustitelné vedou rovněž k proliferaci (STAT dráha), k expresi antiapoptotických genů (Akt kaskáda), k nastartování buněčné pohyblivosti (kaskáda PLC- γ skrz proteiny upravující aktinový cytoskelet) či naopak k transkripci apoptotických genů (*egl-1* skrz MAP kinasovou dráhu (Jiang a Wu, 2014)) nebo diferenciaci (Freeman, 1996). Je tedy nasnadě, že signalisace skrz tuto molekulu vyžaduje přesnou regulaci, a to jak časovou, tak prostorovou. Některé z výše jmenovaných procesů jako proliferace či migrace jsou nezbytné pro správný průběh embryonálního vývoje, jejich opětovné nastartování či hyperaktivace v pozdějších ontogenetických stádiích může zapříčinit vznik patologií (Neve *et al.*, 2000).



Obr. 3: Schéma průběhu aktivace EGF receptoru. Po navázání ligandu (1) následuje změna konformace receptoru provázená vytrčením dimerizačního raménka. Poté dojde k dimerisaci (2) a vzájemné fosforylaci tyrosinových zbytků obou receptorů v C-koncových doménách (3). Fosforylované tyrosiny poté slouží jako vazebná místa pro proteiny signální transdukce. (Vlastní tvorba autorky.)

1.5 Cíl této bakalářské práce

V této práci se budu zabývat principy regulace aktivace EGF receptoru u tří v tomto směru nejlépe prozkoumaných organismů, a sice *Cænorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* a *Homo sapiens sapiens*. Zaměřím se zejména na způsoby, jakými jsou jednotlivé mechanismy uskutečňovány, a na základě těchto informací, byť poněkud kusých, se pokusím vystopovat, jaké trendy se při evoluci signalisace přes EGF receptor uplatnily.

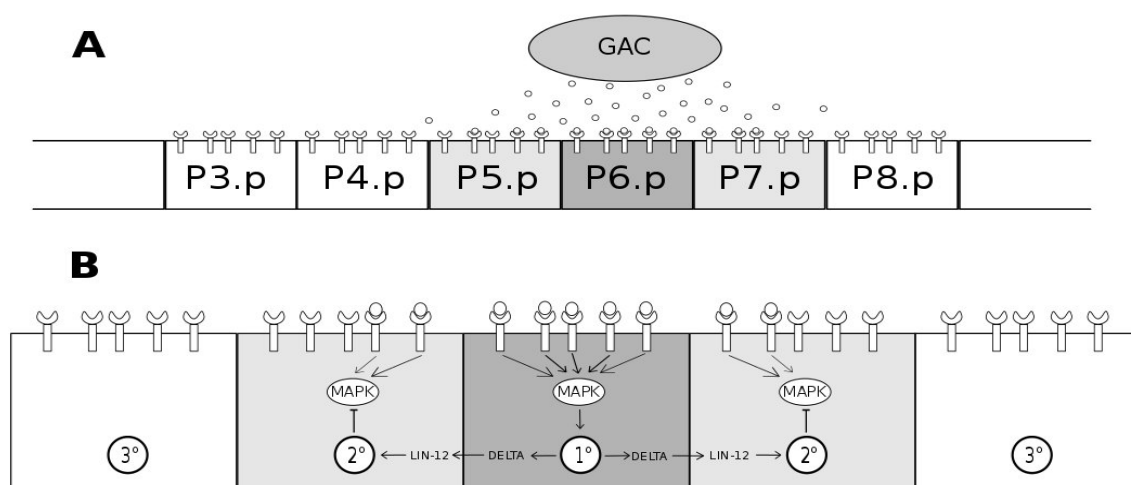
2 *Caenorhabditis elegans*

2.1 Úvod

U *C. elegans* je přítomen jediný EGF receptor zvaný Let-23 (Aroian *et al.*, 1990). Svě jméno obdržel na základě pozorování, že jeho absence způsobuje letalitu larev (Herman, 1978). Pokusy s mutantními formami Let-23 ukázaly, že se uplatňuje při vzniku vulvy, posteriorního ektodermu a samčích spikul (Hajnal *et al.*, 1997). Jeho činnost je rovněž důležitá pro plodnost hermafroditů a životaschopnost larev (Lesá a Sternberg, 1997).

Nejlépe probádaným procesem z hlediska uplatnění signalisace skrz Let-23 je indukce vzniku vulvy (obr. 4), pročez při popisu způsobů jeho regulace budu vycházet především z poznatků shromážděných o tomto ději. Během prvního a druhého larválního stadia je z jedenácti buněk (označovaných Pn.p) ventrální epidermis vybráno šest, které mají potenciál diferencovat ve vulvální buňky a v jejichž plasmatických membránách je Let-23 přítomen. Poté začne buňka nacházející se dorsálně od nich, tzv. ukotvující buňka (gonadal anchor cell, GAC) sekretovat molekulu LIN-3, jediný ligand Let-23 receptoru. Největší množství tohoto parakrinního signálu obdrží buňka P6.p, která je ukotvující buňce nejbližší; spuštění MAP kinasové dráhy v ní kromě posílení exprese *let-23* vyvolá přeměnu v předka 1° linie. P6.p také u svých sousedek, P5.p a P7.p, produkcí DELTA ligandů indukuje spuštění LIN-12/Notch dráhy. Ta v nich způsobí umlčení Let-23 signalisace a umožní proměnu v prekursor 2° linie. Zbylé z šesti vyvolených buněk dostávají pouze slabý LIN-3 i DELTA signál a následují 3° osud, tedy splynutí s epidermálním syncytiem hyp7 (shrnutí v Sternberg, 2005).

Při vzniku jednoho jediného orgánu tedy dochází k uplatnění jak pozitivních tak negativních regulačních mechanismů aktivace EGF receptoru. Dokonce jsme svědky situace, kdy se jejich využití liší u dvou bezprostředně sousedících buněk.



Obr. 4: Indukce 1° a 2° buněčných linií při vývoji vulvy prostřednictvím signalisace přes Let-23 receptor. GAC, ukotvující buňka; MAPK, MAP kinasová signální kaskáda. Překresleno podle Escobar-Restrepo a Hajnal, 2014.

2.2 Transkripční regulace Let-23 signalisace

Studie Flibotte *et al.*, 2016 ukázala, že fenotypy jedinců se změnami v aktivitě chromatin remodelujícího komplexu SWI/SNF v P6.p buňkách přesně kopírují fenotypy pokusných individuí se stejnými změnami v aktivitě Let-23: slabé snížení SWI/SNF aktivity vedlo, stejně jako částečná inaktivace Let-23, k „multivulva“ fenotypu, zatímco úplné potlačení SWI/SNF, podobně jako silné potlačení Let-23, způsobilo chybění vulvy („vulvaless“ fenotyp). V jiných buňkách však SWI/SNF expresi *let-23* zabraňuje, protože je nasnadě, že se v této regulační cestě angažuje ještě nějaká jiná molekula/molekuly.

V případě ligandu, jehož exprese je omezena na ukotvující buňku, hraje nezastupitelnou roli 59 bp dlouhý zesilovač transkripce uvnitř jednoho z intronů. Jeho sekvence obsahuje dva E-box elementy a jedno vazebné místo pro nuclear hormone receptor (NHR). Na E-boxy se váže protein HLH-2, homolog E-proteinu savců a Daughterless u *Drosophily*, který zajišťuje specifickou expresi *lin-3* v této buňce (Hwang a Sternberg, 2004).

Další geny, které se regulace transkripce *lin-3* účastní, lze najít pod souhrnným názvem synMuv, neboť mutace v nich u háďátek způsobuje „synthetic multivulva“ fenotyp. Jedná se z velké části o jaderné a chromatin remodelující proteiny (Ceol a Horvitz, 2004; Davison *et al.*, 2005; Ferguson a Horvitz, 1989).

2.3 Regulace alternativním sestřihem receptoru

Sekvenováním cDNA genu *let-23* bylo odhaleno, že se jeho mRNA v buňkách háďátka vyskytuje ve dvou sestřihových variantách. První z nich obsahuje exony 1–18. Druhá na 5' konci začíná tzv. splice leader 1 (SL1) sekvencí, vyskytující se i na jiných mRNA tohoto organismu (Krause a Hirsh, 1987). Na ni navazují dva exony kódované před exonem 1, který je však v průběhu úprav pre-mRNA vystřižen, takže zbytek sekvence je tvořen exony 2–18 (Sakai *et al.*, 1996). Pokusy s návratem k původnímu fenotypu („rescue“ jedinců bez vulvy – vulvaless fenotyp) však ukázaly, že forma obsahující SL1 sekvenci mutanty „zachraňovala“ s významně nižší úspěšností. Je tedy možné, že sestřihové varianty *let-23* mají při vývoji vulvy vzájemně nezastupitelnou úlohu, nebo že přítomnost SL1 na cDNA tohoto receptoru má inhibiční vliv na jeho expresi (Sakai *et al.*, 1996). Výzkum, který by tyto hypotézy ověřil, však dosud neproběhl.

2.4 Regulace lokalisací receptoru

Šest potencionálních předchůdkyň vulválních buněk je součástí polarisovaného epitelu (shrnutí v Kim, 1997), což znamená, že jejich apikální a basolaterální strana se vzájemně liší co do skladby membránových komponent, lipidů i proteinů. Za fyziologického stavu je receptor Let-23 rozmístěn rovnoměrně po celém obvodu epiteliální buňky a je tak připraven reagovat na signál přicházející z basolaterální strany od ukotvující buňky (Skorobogata a Rocheleau, 2012). Mutantní receptor s chybějícími šesti C-koncovými aminokyselinami však zůstává nahromaděn na apikální straně, kde ovšem nemůže na žádný signál odpovídat a k vytvoření vulvy proto nedochází. Stejně tomu je i v buňkách jedinců s null mutací v genu *lin-7* (Kaeck *et al.*, 1998). Poněvadž také mutantní v genech *lin-2* a *lin-10* vykazují „vulvaless“ fenotyp (Ferguson a Horvitz, 1985) a poněvadž bylo prokázáno, že proteiny LIN-2, LIN-7 a LIN-10 spolu

tvoří komplex vážící se skrze PDZ doménu LIN-7 na C-konec Let-23 (Kaeche *et al.*, 1998), lze právě těmto třem proteinům (a oněm šesti C-koncovým aminokyselinám) přiřknout hlavní úlohu při cílení EGF receptoru na basolaterální membránu (Kaeche *et al.*, 1998; Simske *et al.*, 1996).

Aktivitu této trojice proteinů antagonizuje proteinový komplex AGEF-1/Arf GTPasa/AP-1. Není ovšem dosud známo, zda tak činí přímou interakcí, nebo zkrátka jen díky tomu, že jeho hlavní rolí je udržovat polarisaci VPC (Skorobogata *et al.*, 2014).

Dalším faktorem ovlivňujícím lokalisaci receptoru je protein Erm-1. Jeho funkcí je propojení transmembránových či s membránou asociovaných proteinů s aktinovým cytoskeletem (Algrain *et al.*, 1993). U P6.p buňky fixuje neaktivní Let-23 na basolaterální membráně a brání jeho endocytose. Žádaným efektem pak může být, že buňky 1° linie mají na své basolaterální membráně stále k dispozici zásobu EGF receptorů, které mohou být aktivovatelné LIN-3 signálem a zajistit tak dlouhodobou stimulaci MAP kinasové dráhy (Haag *et al.*, 2014).

2.5 Regulace vazbou ligandu

Jediným ligandem Let-23 je LIN-3, ortolog savčího epidermálního růstového faktoru. Během indukce tvorby vulvy je jeho hlavním zdrojem ukotvující buňka (Hill a Sternberg, 1992) (obr. 4). Vazba LIN-3 receptor aktivuje a vyústí ve spuštění MAP kinasové signální dráhy, jejímž cílem jsou rozličné jaderné molekuly jako transkripční faktory LIN-1 a LIN-31 (Tan *et al.*, 1998), gen pro fibroblastový růstový faktor (FGF) *egl-17* (Burdine *et al.*, 1998) nebo Hox-protein LIN-39 (Maloof a Kenyon, 1998). Zároveň také dochází k endocytose receptoru a tím pádem též k ukončení signalisace (Haigler *et al.*, 1979). Ektopická exprese LIN-3 internalisací Let-23 ještě posílí a navodí jeho hromadění na apikální straně VPC (Haag *et al.*, 2014).

2.6 Regulace alternativním sestřihem ligandu

U háďátka byly nalezeny celkem tři sestřihové varianty LIN-3: krátká LIN-3S, delší LIN-3L a nejdelší LIN-3XL (Dutt *et al.*, 2004). Ukotvující buňka, hlavní a nezastupitelný zdroj LIN-3 při vývoji vulvy (Kimble, 1981), sekretuje LIN-3S, zato produkce formy LIN-3L je lokalizována v prekursorových buňkách vulvy a je závislá na aktivitě intramembránové proteasy ROM-1 z rodiny rhomboid-like proteas. LIN-3L isoforma se od krátké varianty liší pouze v patnácti aminokyselinách přidaných vedle štěpicího místa ROM-1 (Dutt *et al.*, 2004). Ty mohou hrát roli retenčního signálu pro Golgiho aparát (GA) a zapříčiňovat tak nezbytnost proteolytického štěpení pro úspěšné projití na konec sekreční dráhy, podobně jako v případě EGFR ligandu Spitz u *Drosophily* (Dutt *et al.*, 2004). Stejní autoři též nabízejí model, podle něhož při indukci tvorby vulvy dochází k sekvenčnímu zesílení signálu: jako odpověď na signál v podobě LIN-3S od ukotvující buňky je v buňce P6.p zesílena exprese ROM-1, díky čemuž se nashodí produkce LIN-3L, která společně s laterální LIN-12/Notch signalisací u buněk P5.p a P7.p indukuje přeměnu na 2° linii. Funkce varianty LIN-3XL nebyla dosud uspokojivě prozkoumána (Dutt *et al.*, 2004).

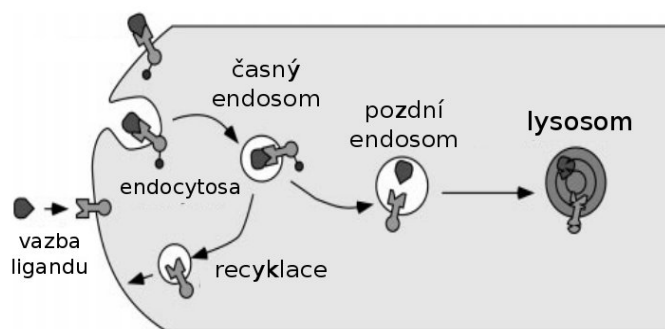
2.7 Regulace dostupností receptoru

Po aktivaci EGF receptoru vazbou ligandu následuje endocytosa receptoru, čímž se snižuje množství molekul, které mohou na signál z extracelulárního prostředí odpovídat (Haigler *et al.*, 1979). Internalisovaný receptor se vydává na jednu ze dvou možných cest: buď se vrací na původní membránu (recyklace), nebo putuje z časných endosomů do multivesicular bodies (MVB) a odtud do lysosomů, kde je rozložen (degradativní cesta) (obr. 5) (Burke *et al.*, 2001).

Endocytované receptory mohou svojí cytosolickou částí dále signalisovat, neboť zůstávají asociovány s adaptorovými a efektorovými proteiny (Burke *et al.*, 2001). Význam tohoto jevu teprve začíná být docenován. Ukazuje se totiž, že právě uzavření aktivovaných EGF receptorů do váčků a jejich putování do nitra buňky se podílí na zesilování signálu směrem k jádru, kam by se složky MAP kinasové dráhy prostou difusí ve fosforylovaném stavu dostávaly dlouho vzhledem k buněčným časovým poměrům (shrnutí v Kholodenko, 2002).

Úplné umlčení Let-23 signalisace tedy zajišťují proteiny, které napomáhají jeho vstupu do degradativní cesty. Mezi ně patří Sli-1 (ortolog savčí c-Cbl) (Jongeward *et al.*, 1995), což je E3 podjednotka ubikvitinligasy. Ta s aktivovaným EGF receptorem interaguje skrz vazbu své SH2 domény na jeho fosforylovaný tyrosin 1225 (viz odst. 2.9) a navazuje na něj ubikvitinylové zbytky předurčující jej k degradaci (Yoon *et al.*, 2000). Dále je to GTPasa Rab-7, jež zajišťuje dopravu Let-23 z pozdních endosomů/MVB do lysosomů (Skorobogata a Rocheleau, 2012). Jako negativní regulátor lze z perspektivy vnitrobuněčného váčkového transportního systému označit také dynein, zprostředkovávající pohyb endocytotických váčků směrem k lysosomům (Skorobogata *et al.*, 2016).

Negativním regulátorem negativního regulátoru Rab-5 je protein Eps-8. Jeho exprese je v buňce P6.p posílena díky pozitivní zpětné vazbě při aktivaci Let-23. Eps-8 asociuje s komplexem LIN-7/LIN-2/LIN-10 zajišťujícím basolaterální lokalizaci receptoru (viz odst. 2.4) a brání endocytose receptoru (Stetak *et al.*, 2006).

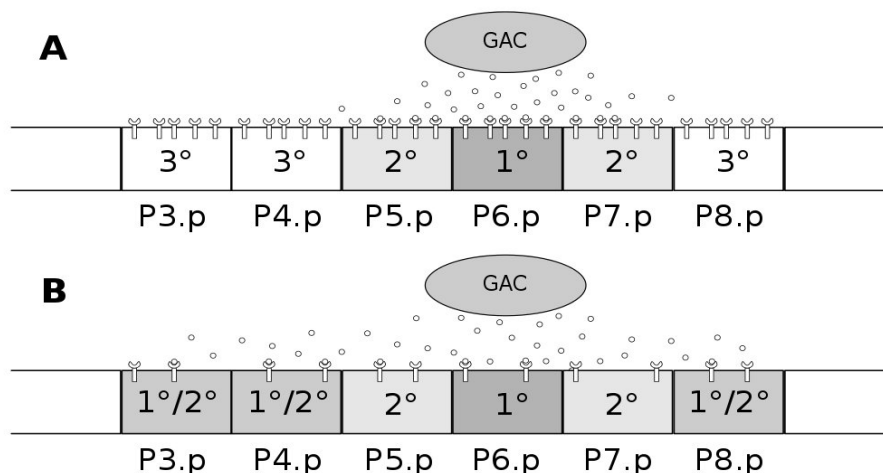


Obr. 5: Osudy endocytovaného Let-23 receptoru. Upraveno podle Burke *et al.*, 2001.

2.8 Regulace dostupností ligandu

Obdržení (silného) signálu v podobě LIN-3 od GAC v buňce P6.p mimo jiné způsobí zesílení exprese Let-23 (Simske *et al.*, 1996). Tudiž se na povrchu této buňky objeví více vazebných míst pro LIN-3,

jehož difuze ke vzdálenějším VPC je takto omezena (obr. 6). Tento model potvrzují pozorování, že mutace částečně oslabující aktivitu Let-23 překvapivě vedou k vytvoření „multivulva“ fenotypu a že overexprese Let-23 tento fenotyp neutralisuje (Hajnal *et al.*, 1997).



Obr. 6: A – U normálního jedince dochází k vyvázání ligandu EGF receptory na P6.p (i P5.p a P7.p) buňkách a zamezení ektopickému vzniku vulvy. B – U mutanta v genu *let-23* a *gap-1* je sekvestrace ligandu nedostatečná a citlivost vůči aktivaci Let-23 receptoru zvýšená. Buňky P3.p, P4.p a P8.p na signál od GAC reagují přeměnou na 1°, 2° nebo smíšenou (1°/2°) linií. GAC, ukotvující buňka. Překresleno podle Hajnal *et al.*, 1997.

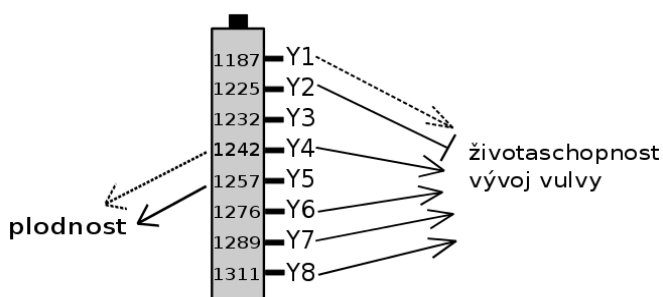
2.9 Regulace fosforylací tyrosinových zbytků

V C-koncové části Let-23 se nachází 8 potencionálních vazebných míst pro domény SH2, jejichž součástí je fosforylovatelný tyrosin (obr. 7). Pokusy kolegů (Lesa a Sternberg, 1997) ukázaly, že projevy ztráty každého z nich nejsou uniformní. Tyrosiny s čísly 1 a 3 (číslováno od N-konce Let-23 receptoru) se při transdukci signálu patrně neuplatňují, zato fosforylace tyrosinu 5 je nezbytné a dostačující pro plodnost. Tyrosiny 6, 7 a 8 pak hrají roli při indukci vulvy a podmiňují životaschopnost. Tyrosin 4 je multifunkční, pozitivně ovlivňuje životaschopnost, plodnost i vývoj vulvy. Tyrosin 2 má negativní vliv na životaschopnost a vývoj vulvy; toto pozorování je v souladu s výsledky jiné vědecké skupiny, která jej identifikovala jako přímé či nepřímé vazebné místo pro Sli-1, protein negativně regulující signalisaci skrz Let-23 (viz odst. 2.7) (Yoon *et al.*, 2000).

Receptor, jenž byl zbaven všech osmi klíčových tyrosinů, však stále vykazoval asi 10% aktivitu vzhledem k svému nezměněnému protějšku. Je tedy možné, že některé signál předávající proteiny s Let-23 interagují jinak než prostřednictvím SH2 domén, nebo že signalisace může probíhat také skrze fosforylaci tyrosinů v jiných částech receptoru (Lesa a Sternberg, 1997).

Obr. 7:

Fosforylace jednotlivých tyrosinových zbytků je klíčová pro různé fenotypové projevy. Zobrazena je pouze C-koncová doména EGF receptoru. Překresleno podle Lesa a Sternberg, 1997.



3 *Drosophila melanogaster*

3.1 Úvod

U octomilky se rovněž vyskytuje jediný EGF receptor, zvaný DER (*Drosophila* EGF receptor) (Livneh *et al.*, 1985). Na rozdíl od hádátka se při jeho regulaci uplatňují hned čtyři ligandy (Neuman-Silberberg a Schüpbach, 1993; Reich a Shilo, 2002; Rutledge *et al.*, 1992; Schneppe *et al.*, 1996). Aktivovaný EGF receptor spouští MAP kinasovou signální kaskádu, která následně posílí transkripci jaderných genů nezbytných pro započetí buněčného dělení (Brunner *et al.*, 1994) nebo diferenciace (Schneppe *et al.*, 1996; Schweitzer *et al.*, 1995). Signalisace skrze DER je nezbytná pro mnoho různých procesů napříč stadii ontogenetického vývoje: od indukce ventrálního ektodermu a položení základů nervové soustavy v raném embryonálním stadiu (Raz a Shilo, 1993; Skeath, 1998) přes položení základu křídel, cév a očí u larvy či kukly (Domínguez *et al.*, 1998; Martin-Blanco *et al.*, 1999; Nagaraj *et al.*, 1999) po ustanovení obou hlavních tělních os při zrání oocytů u dospělce (Neuman-Silberberg a Schüpbach, 1996). Není tedy divu, že nulová mutace v *der* genu je embryonálně letální, což výzkum funkce EGF receptoru značně ztěžuje (Freeman, 1996; Price *et al.*, 1989).

3.2 Transkripční regulace DER signalisace

Jelikož je EGF receptor exprimován hojně v mnoha tkáních, vypadá to, že hlavní regulace jeho aktivity se odehrává posttranskripčně (Zak *et al.*, 1990).

Naproti tomu exprese většiny ligandů DER vykazuje výraznou tkáňovou specificitu, transkripční regulace u nich tedy hraje klíčovou roli (Neuman-Silberberg a Schüpbach, 1993; Reich a Shilo, 2002; Schneppe *et al.*, 1996). Jedinou výjimkou je Spitz, jenž je hojně exprimován napříč tkáněmi i ontogenetickými stadii (Rutledge *et al.*, 1992); regulace jeho biologické aktivity se tedy odehrává na posttranslační úrovni (viz odst. 3.4.1) (Schweitzer *et al.*, 1995).

3.3 Regulace alternativním sestřihem receptoru

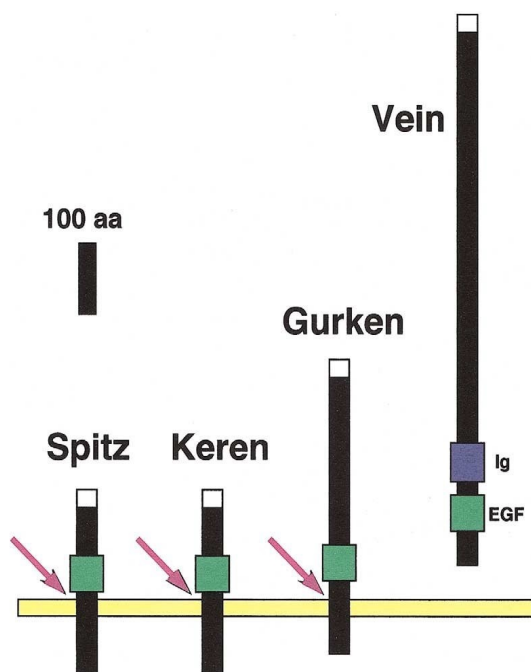
Byly popsány celkem tři sestřihové varianty DER lišící se v sekvenci na nejzazším 5' konci transkriptu (Schejter *et al.*, 1986). Jelikož však jejich distribuce u embrya, larvy i dospělce vykazuje nápadnou uniformitu, je nejvýš pravděpodobné, že významnou regulační roli nehrají (Schejter *et al.*, 1986).

3.4 Regulace vazbou ligandu

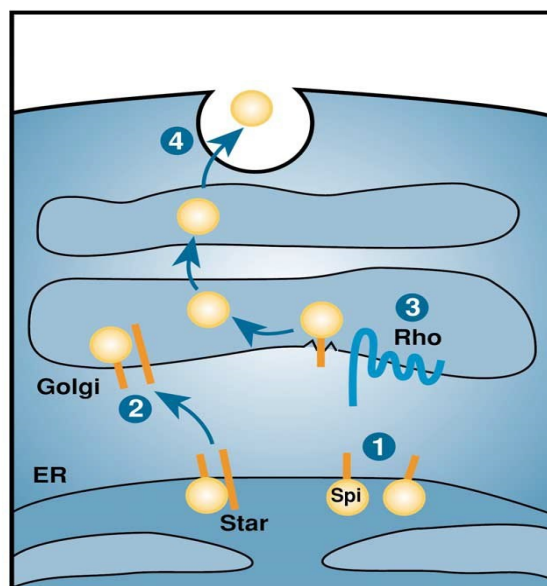
U *Drosophily* byly dosud objeveny čtyři ligandy EGF receptoru: Spitz, Vein, Gurken a Keren. Tři z nich jsou, podobně jako LIN-3 u hádátka nebo EGF u savců, tvořeny ve formě transmembránových prekursorů (Neuman-Silberberg a Schüpbach, 1993; Reich a Shilo, 2002; Rutledge *et al.*, 1992); pouze Vein je produkován jako solubilní protein (obr. 8) (Schneppe *et al.*, 1996). Při uvolňování sekretovaných forem ligandů se uplatňují intramembránové proteasy z rodiny rhomboid, jichž je v genomu octomilky kódováno celkem sedm, z toho šest aktivních (Wasserman *et al.*, 2000; Urban *et al.*, 2002).

3.4.1 Spitz

Spitz je nejdéle známý ligand DER (Rutledge *et al.*, 1992). Jeho transmembránová precursorová forma postrádá schopnost aktivovat EGF receptor, protože hlavním regulačním krokem jeho produkce je proteolytické štěpení (Schweitzer *et al.*, 1995). To se odehrává v Golgiho aparátu prostřednictvím intramembránové proteasy Rhomboid 1, která se ve Spitz produkujících buňkách nalézá výhradně v tomto vnitrobuněčném kompartmentu (J. R. Lee *et al.*, 2001; Urban *et al.*, 2001). Lokalisace proteolytického štěpení do Golgiho aparátu je klíčové pro správnou glykosylaci ligandu: dojde-li k proteolyse dříve, než jsou na lumenální část Spitzu připojeny O-vázané cukerné zbytky – např. již v endoplasmatickém retikulu –, glykosylace „předčasně solubilní“ formy Spitzu již neprobíhá, „špatně vyrobený“ ligand není sekretován a hromadí se uvnitř buňky (Urban *et al.*, 2002). Bylo rovněž prokázáno, že pro efektivní transport Spitzu do Golgiho aparátu je potřebný protein Star – bez jeho přítomnosti totiž transmembránový precursor ligandu zůstává v endoplasmatickém retikulu (J. R. Lee *et al.*, 2001).



Obr. 8: Schematické znázornění čtyř ligandů DER. Ig, imunoglobulinová doména; EGF, EGF-like doména. Šipky označují místa štěpení. Převzato z Shilo, 2003.



Obr. 9: Role proteinů Star a Rhomboid při tvorbě biologicky aktivní formy Spitzu. Spitz se do ER dostává ve formě transmembránového precursoru (1). K jeho transportu do GA (2) je nezbytný protein Star. V GA dochází k odštěpení ektodomény precursoru proteasou Rhomboid (3). Solubilní Spitz je vyloučen s buňky (4). Rho, Rhomboid; Spi, Spitz. Převzato z Shilo, 2003.

Mezi procesy, při nichž se Spitz uplatňuje, patří indukce ventrálního ektodermu a diferenciace buněk složeného oka. V prvním jmenovaném případě je Spitz produkován buňkami střední linie a u nejbližších ektodermálních buněk skrze silnou aktivaci DER vypůsobí přeměnu na ventrální ektoderm (Schweitzer *et al.*, 1995). Ke vzdálenějším buňkám se, díky sekreci inhibičního proteinu Argos (viz odst. 3.5), dostane pouze slabý signál, což vyústí v slabší aktivaci DER a jejich přeměnu na ventrolaterální ektoderm (Golembo

et al., 1996; Raz a Shilo, 1993).

Vývoj složeného oka je příkladem, že Rhomboid 1 není jedinou proteasou zajišťující štěpení Spitzu. Bylo prokázáno, že při sekreci ligandů se vzájemně doplňují Rhomboid 1 a Rhomboid 3; jelikož však mutace v druhém jmenovaném proteinu způsobují větší fenotypovou změnu, vypadá to, že role Rhomboidu 3 je o něco významnější (Wasserman *et al.*, 2000). Proces vedoucí k diferenciaci jednotlivých buněčných typů začíná od fotoreceptorové buňky R8 uprostřed budoucího ommatidia, která produkuje Spitz a Keren. Ty aktivují DER nejbližších buněk a vypůsobí v nich jednak diferenciaci ve fotoreceptory, jednak započetí produkce inhibičního ligandu Argos. Poté, co je přeměna indukovaných buněk dokončena, stanou se tyto novými zdroji Spitzu a Kerenu a stejným způsobem vypůsobí diferenciaci buněk okolo sebe. Celá smyčka se opakuje ještě několikrát, dokud není rozrůznění na jednotlivé buněčné typy dokonáno (Freeman, 1996).

3.4.2 Keren

Keren je zatím posledním přírůstkem do skupiny ligandů DER. Svou aminokyselinovou sekvencí i celkovou strukturou nejvíce připomíná Spitz, avšak na rozdíl od něj je exprimován jen velmi slabě (Reich a Shilo, 2002). Jeho pre-mRNA může být sestřižena dvěma různými způsoby. První vede ke spojení 5' UTR s kódující sekvencí pro Keren, druhý ke spojení stejné 5' UTR s kódující sekvencí zcela jiného proteinu. Frekvence alternativního sestřihu tedy může být jedním ze způsobů regulace produkce tohoto ligandu (Reich a Shilo, 2002). Podobně jako v případě Spitzu je efektivní produkce Kerenu závislá na činnosti proteinů Star a Rhomboid (obr. 9) (Reich a Shilo, 2002). Jelikož však retenční signál pro ER není tak silný jako u Spitzu, dochází k občasnému úniku prekursoru Keren do Golgiho aparátu (nebo až na plasmatickou membránu) i bez přítomnosti Staru (Reich a Shilo, 2002). Bylo však prokázáno, že na rozdíl od Spitzu Keren podstupuje také méně časté, na Staru a Rhomboidu nezávislé štěpení, pravděpodobně díky dosud neidentifikované serinové protease (Reich a Shilo, 2002). Při ektopické expresi Kerenu k tomuto basálnímu štěpení docházelo rovněž, z čehož lze vyvodit, že ona záhadná proteasa je všudypřítomná a že v tomto případě bude hlavní regulační roli hrát transkripční kontrola ligandu (Reich a Shilo, 2002).

Při vývoji octomilky se Keren vzájemně doplňuje s ostatními ligandy, např. se Spitzem při indukci diferenciaci buněk v ommatidiích (Brown *et al.*, 2007).

3.4.3 Gurken

Gurken, poslední z ligandů DER tvořených z transmembránového prekursoru, je spjat především s procesy probíhajícími při zrání vaječného folikulu (Neuman-Silberberg a Schüpbach, 1993). Je exprimován ve formujícím se oocytu, přičemž jeho lokalizace je, alespoň v časných stádiích maturace, dána posicí odpovídající mRNA (Neuman-Silberberg a Schüpbach, 1996). Podobně jako u Spitzu a Kerenu biologickou aktivitu vykazuje pouze solubilní forma odštěpovaná z membránového prekursoru nejspíše proteasou Brother-of-Rhomboid (neboli Rhomboid 2) (Ghiglione *et al.*, 2002; Guichard *et al.*, 2000; Urban *et al.*, 2002). Pro efektivní sekreci tohoto ligandu je kromě Staru potřebný také protein Cornichon (Roth *et al.*, 1995). Uvolněný Gurken aktivuje EGF receptory na nejbližších buňkách folikulu a spouští v nich MAP

kinasovou kaskádu vedoucí k jejich diferenciaci a také v nich nastartuje produkci zpětného signálu pro oocyt (Peri *et al.*, 1999; Roth *et al.*, 1995). Nejprve se tento proces odehrává na budoucím posteriorním konci oocyty a vyúsťuje v ustavení předozadní (anterioposteriorní) osy a v přesun jádra oocyty i *gurken* mRNA do budoucí anteriodorsální části, kde se v průběhu střední fáze maturace odehraje totéž (Roth *et al.*, 1995).

3.4.4 *Vein*

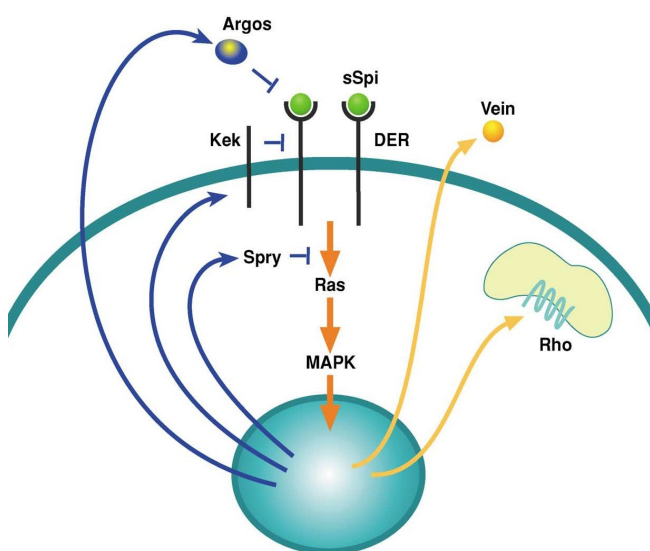
Vein se od ostatních ligandů DER liší hned v několika ohledech. Za prvé tím, že postrádá transmembránovou doménu a pro svou aktivaci tudíž nevyžaduje proteolytické štěpení; za druhé tím, že kromě EGF-like domény obsahuje též imunoglobulinovou (Ig-like) doménu, čímž se podobá savčím neuregulinům (Schnepf *et al.*, 1996). Jeho mRNA existuje ve dvou sestřihových variantách lišících se v jediném intronu, není však známo, zda jsou jejich proteinové produkty rozrůzněny ve svých biologických aktivitách (Schnepf *et al.*, 1996). Působnost Veinu se z velké části překrývá se Spitzem: podílí se na vzniku ventrálního a ventrolaterálního ektodermu a také na diferenciaci žilek při vývoji křídel (Martin-Blanco *et al.*, 1999). Na rozdíl od Spitzu však EGF receptor aktivuje daleko slaběji (Schnepf *et al.*, 1998). Prostorová exprese Veinu je omezena pouze na vybrané buněčné populace (dva ventrolaterální proužky u gastruly, břišní střední páska u pozdní gastruly, základy periferní nervové soustavy a chordotonálních orgánů, stěna střeva u pozdního embrya), a to nejspíše díky ovlivnění transkripce, neboť proteolytická regulace jeho sekrece nepripadá v úvahu (Schnepf *et al.*, 1996).

3.5 Regulace negativní zpětnou vazbou

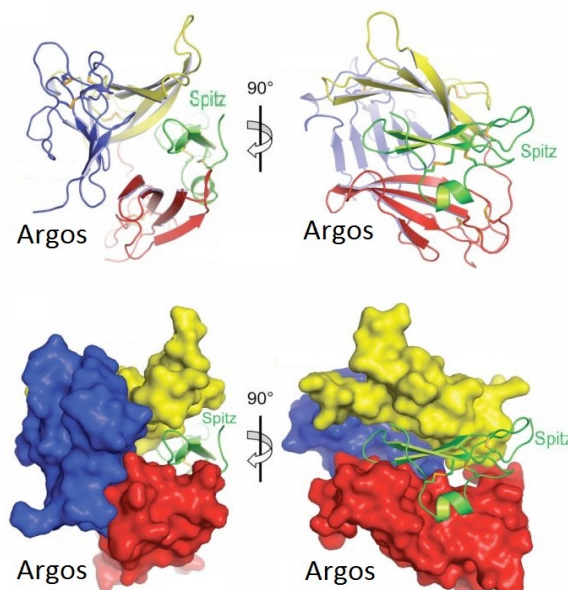
Silnou aktivaci EGF receptoru zpravidla následuje sekrece proteinu Argos (Golembo *et al.*, 1996). Ten z okolí buňky vyvazuje Spitz a působí tak utlumení signalisace skrze DER (obr. 10) (Klein *et al.*, 2004). Argos je strukturně podobný extracelulárním doménám receptorů pro TGF β či BMP, skládá se ze tří domén tvořených β -listy a Spitz váže prostřednictvím dvou vazebných míst ve dvou různých doménách, podobně jako EGF receptor (obr. 11) (Ferguson *et al.*, 2003; Klein *et al.*, 2008). Ačkoli bylo předpokládáno, že Argos jako solubilní molekula působí na dlouhou vzdálenost (model tzv. vzdálené inhibice, Golembo *et al.*, 1996), výsledky výpočetní analýsy naznačují, že pravdou může být pravý opak (Reeves *et al.*, 2005).

Aktivaci EGF receptoru je spouštěna také exprese transmembránového proteinu Kekk², která však na rozdíl od Argosu vykazuje stupňovitý charakter (Ghiglione *et al.*, 1999). Kekk se pomocí na leucin bohatých domén (leucin-rich repeats, LRR) ve své extracelulární části váže na DER tak, že znemožňuje vazbu ligandu (Ghiglione *et al.*, 2003). Na této interakci se podílí také jeho transmembránový úsek (Ghiglione *et al.*, 1999), zatímco cytosolická část Kekkonu je nezbytná pro jeho správnou – apikální – lokalizaci (Ghiglione *et al.*, 2003). Mutace v tomto regulačním proteinu se ve fenotypu nijak výrazně neprojevují, což je známkou překrývajících se funkcí inhibitorů DER (Musacchio a Perrimon, 1996).

2 V genomu *Drosophily* bylo dosud identifikováno celkem šest lokusů nazývaných *kekkon*, avšak inhibiční vliv na DER byl dosud popsán pouze u Kekkonu 1 (Alvarado *et al.*, 2004). Není-li uvedeno jinak, je v této práci pod pojmem Kekk kon míněn vždy pouze proteinový produkt tohoto genu.



Obr. 10: Schéma mechanismů působení inhibitorů DER. Kek, Kekkon; Spry, Sprouty; sSpi, solubilní forma Spitzu. Převzato z Shilo, 2003.



Obr. 11: Argos inhibuje aktivaci DER vyvazováním ligandu Spitz do komplexu 1:1. Upraveno podle Klein *et al.*, 2008.

Dalším proteinem, jehož exprese je podmíněna aktivací MAP kinasové dráhy, je Sprouty (Casci *et al.*, 1999). Jedná se o intracelulární protein asociovaný s vnitřní stranou plasmatické membrány (Casci *et al.*, 1999). Princip jeho inhibičního působení je zřejmě založen na znemožnění správného sestavení proteinů signální transdukce do komplexu vazbou na dva z nich, Drk a Gap-1 (Casci *et al.*, 1999).

Echinoid je transmembránový protein s šesti Ig-like doménami homologický L1-rodině adhezních molekul (Bai *et al.*, 2001). Podobně jako ony interaguje se svými protějšky na okolních buňkách a také podstupuje odštěpování ektodomény (Spencer a Cagan, 2003). Na rozdíl od výše popsanych inhibitorů DER však zřejmě nepodléhá transkripční regulaci (Bai *et al.*, 2001). Bylo prokázáno, že Echinoid na plasmatické membráně kolokalisuje s DER, že je v odpověď na jeho aktivaci fosforylován (Spencer a Cagan, 2003) a konečně též že cytosolická část Echinoidu je nezbytná pro jeho inhibiční vliv na EGF receptor (Islam *et al.*, 2003). Podle modelu vycházejícího z poznatků o inhibitech aktivity tyrosinkinasových receptorů u obratlovců se na fosforylovaný Echinoid váže protein Corkscrew, který tím pádem nemůže zprostředkovat interakce mezi efektorovými proteiny signální transdukce (Spencer a Cagan, 2003).

Specifickým inhibitorem EGF receptoru je rovněž Fasciclin-2 (Mao a Freeman, 2009). Je-li, stejně jako u Argosu či Kekkonu, jeho exprese závislá na aktivaci DER, není dosud spolehlivě potvrzeno, a také přesný mechanismus inhibice zůstává neobjasněn (Mao a Freeman, 2009).

3.6 Regulace dostupností receptoru

Podobně jako u *C. elegans* je i u *Drosophila* množství receptoru dostupného pro navázání ligandu negativně ovlivňováno ubikvitinligasou D-Cbl, která po jeho aktivaci napomáhá endocytose (Pai *et al.*, 2000). D-Cbl se vyskytuje ve dvou isoformách: isoforma L obsahuje jak RING doménu klíčovou pro internalisaci EGF receptoru, tak na prolin bohatou doménu (proline-rich region, PRR), u isoformy S však PRR chybí (Pai *et al.*, 2006). D-CblL navozuje endocytosu aktivovaného EGF receptoru v závislosti na míře své exprese, zatímco činnost D-CblS tuto závislost nevykazuje (Pai *et al.*, 2006). L-forma ubikvitinligasy endocytovaný receptor cílí do Rab5/Rab7 dráhy končící jeho degradací v lysosomech (Chang *et al.*, 2008), spolupracujíc při tom s proteinem Drk (Wang a Pai, 2011). S ohledem na skutečnost, že buněčná lokalisace forem S a L se zdá být odlišná, lze předpokládat, že EGF receptor endocytovaný za účasti D-CblS směřuje do jiné transportní dráhy (Pai *et al.*, 2006).

3.7 Regulace dostupností ligandu

Pozoruhodnou roli hraje výše zmíněná D-Cbl ubikvitinligasa při zrání oocyty. Bylo prokázáno, že efektivní pohlcování EGF receptoru s navázaným proteinem Gurken buňkami folikulu mimo jiné zamezuje příliš daleké difusi tohoto ligandu a tedy i dorsalisaci embrya (Chang *et al.*, 2008).

Jiným proteinem podílejícím se na regulaci dostupnosti ligandů je Rhomboid 5 – nazývaný také iRhom –, který postrádá proteolytickou aktivitu (Urban *et al.*, 2002). Jeho exprese byla prokázána v buňkách dávajících vznik nervové soustavě u všech ontogenetických stadií a jeho absence spojena s častějším upadáním do spánku (Zettl *et al.*, 2011). iRhom se vyskytuje toliko v endoplasmatickém retikulu, kde interaguje s prekursory ligandů DER a vysílá je na cestu tzv. degradace asociované s endoplasmatickým retikulem (ER-associated degradation, ERAD) (Zettl *et al.*, 2011). Pouť nešťastných ligandů zřejmě končí v proteasomech, neboť inhibitory těchto „buněčných štěpkovačů“ činnost iRhomu efektivně hatí (Zettl *et al.*, 2011).

4 *Homo sapiens sapiens*

4.1 Diversita lidských EGF receptorů

U člověka jsou přítomny hned čtyři EGF receptory: ErbB1 známý jako EGFR nebo HER1, ErbB2 označovaný HER2 či Neu, ErbB3 zvaný též HER3 a konečně ErbB4 neboli HER4 (Cohen *et al.*, 1980; Kraus *et al.*, 1989; Plowman *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 1986). Za účelem zachování jednotné terminologie budu v této práci používat názvy ErbB1, ErbB2, ErbB3 a ErbB4.

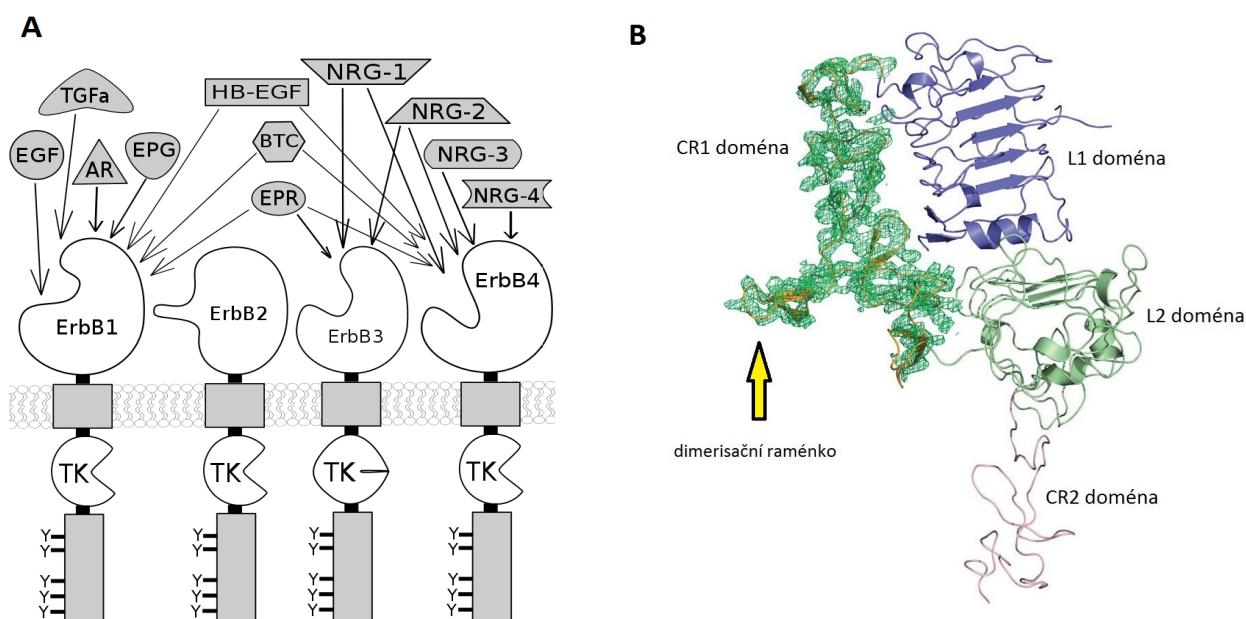
Prvním popsáním EGF receptorem se stal ErbB1 (Cohen *et al.*, 1980). Nachází se na všech epiteliálních a stromálních buňkách, na vybraných buňkách gliových a některých buňkách hladkých svalů (shrnutí v Wells, 1999), ve fibroblastech a naopak chybí v melanocytech (Kraus *et al.*, 1989). U polarizovaných buněk epitelů je přítomen především na basolaterální straně, čímž je zabráněno jeho nežádoucí aktivaci ligandy produkovanými do lumen (Marti *et al.*, 1989). ErbB1 má zachovanou jak schopnost vázat ligandy (viz odst. 4.5) tak tyrosinkinasovou aktivitu (obr. 12 A) (S. Cohen *et al.*, 1982).

Naproti tomu ErbB2 schopnost vázat ligandy zřejmě nemá, neboť žádná přirozeně se naň vážící molekula přes velkou snahu dosud nebyla identifikována (Klapper *et al.*, 1999; Kochupurakkal *et al.*, 2005). Krystalová struktura jeho extracelulární domény odhalila, že domény L1 a L2 svou polohou napodobují konformaci receptoru s navázaným ligandem (obr. 12 B) (Hu *et al.*, 2015). Tyrosinkinasová doména tohoto EGF receptoru však je plně funkční (Holmes *et al.*, 1992). ErbB2 najdeme na nervosvalových spojích (Zhu *et al.*, 1995) a také v mléčné žláze (Neve *et al.*, 2000), v keratinocytech, melanocytech, epitelech žláz i ve fibroblastech (Kraus *et al.*, 1989).

Receptor ErbB3 se vyskytuje v keratinocytech, melanocytech, epitelu žaludku, plic či ledvin, také v mozku, v placentě (Kraus *et al.*, 1989) a na nervosvalových spojích (Zhu *et al.*, 1995), ovšem nikoli ve fibroblastech ani lymfoidní tkáni (Kraus *et al.*, 1989). Co do signalizačních vlastností je přesným opakem ErbB2: na jeho extracelulární část se váží rozličné ligandy (viz odst. 4.5), avšak doména tyrosinkinasová má, ve srovnání s ErbB1, prakticky nulovou schopnost fosforylovat (Guy *et al.*, 1994).

Poslední z ErbB receptorů, ErbB4, se rovněž vyskytuje na postsynaptických membránách nervosvalových spojů (Zhu *et al.*, 1995), hojně v mozku, srdci, ledvinách (Plowman *et al.*, 1993), mozečku, míše (Elenius *et al.*, 1999, 1997) a konečně též v mléčné žláze (Sawyer *et al.*, 1998). Podobně jako ErbB1 je aktivován několika ligandy a rovněž jeho tyrosinkinasová aktivita je neporušena (Plowman *et al.*, 1993; Riese *et al.*, 1996).

Je však potřeba mít na paměti, že z důvodů etických a legislativních byly mnohé pokusy, např. s knock-outy genů, prováděny na myších a teprve podle jejich výsledků usuzováno na způsob fungování dotyčných molekul v lidském těle (Sibilia *et al.*, 2007).



Obr. 12: **A** – Schematické znázornění čtyř EGF receptorů u savců a jejich interakcí s ligandy. AR – amphiregulin, BTC – betacellulin, EPG – epigen, EPR – epiregulin. Překresleno podle Seshacharyulu *et al.*, 2012. **B** – Struktura extracelulární části ErbB2. Posice L domén tvořících u ostatních ErbB molekul vazebné místo pro ligand odpovídá konformaci receptoru s navázaným ligandem (srovnej s obr. 2). Upraveno podle Hu *et al.*, 2015.

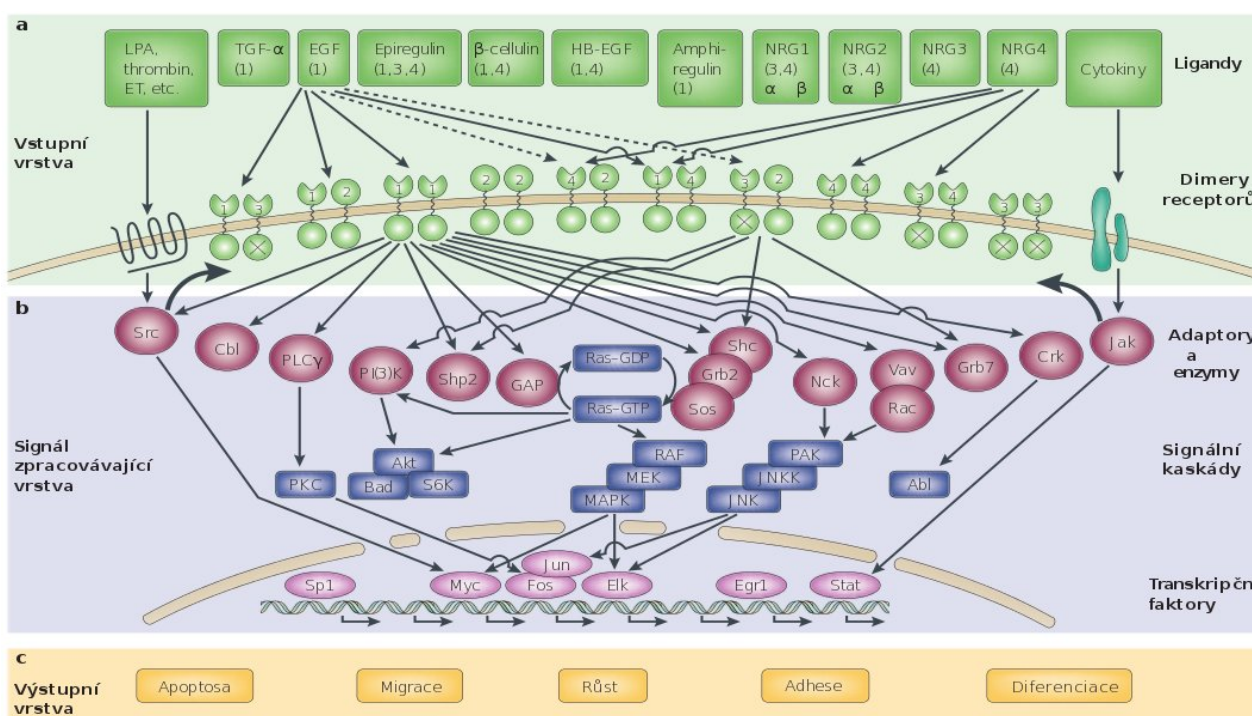
4.2 Biologické efekty aktivace EGF receptorů

Důsledky aktivace ErbB receptorů se do značné míry odvíjejí od toho, jaké dráhy signální transdukce jsou jimi právě spouštěny (obr. 13). Stimulací MAP kinasové kaskády, pro EGF receptory tolik typické, jsou pozitivně ovlivněny transkripční faktory c-Myc a Elk, které usnadňují překonání kontrolních bodů buněčného cyklu a započítí dělení a napomáhají též přežití buněk (Booy *et al.*, 2011; Neve *et al.*, 2000). Aktivaci Akt (PKB) kinasy prostřednictvím PI-3 kinasy je zase docíleno odklizení molekul bránících proliferaci do cytoplasmy (Viglietto *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2001a) popř. jejich degradace (Zhou *et al.*, 2001b), jakož i zablokování proapoptotické kaspázy 9 fosforylací (Cardone *et al.*, 1998). Dráha PLC- γ naopak působí umlčení MAP kinasové kaskády a skrze stimulaci proteinů remodelujících aktinový cytoskelet usnadňuje buněčnou pohyblivost (Wells *et al.*, 1998). Fosforylace transkripčních faktorů STAT rovněž vede k posílení exprese proteinů posilujících proliferaci, např. c-Myc, c-Fos nebo p21 (Shirogane *et al.*, 1999; Sinibaldi *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2003). Kromě těchto „klasických“ drah signální transdukce byla popsána také situace, kdy ErbB receptor (či jeho část) putuje do jádra a spolu s dalšími proteiny se podílí na transkripci genů (Komuro *et al.*, 2003; Ni *et al.*, 2001).

4.3 Transkripční regulace EGFR signalisace

Co se ErbB receptorů týče, bylo doposud vyzkoumáno, že v mléčné žláze je transkripce ErbB1 i ErbB2 negativně regulována přítomností estrogenu (Borg *et al.*, 1994; Yarden *et al.*, 2001; Yoshimaru *et al.*, 2015). Nicméně jiná studie předchozí tvrzení nevyvracejíc ukazuje, že promotor ErbB1 genu je pozitivně regulován skrze vazbu estrogenu na jeho receptor (Salvatori *et al.*, 2000).

O transkripční regulaci ligandů je toho známo mnohem více. Transkripci TGF α a amphiregulinu posiluje protein Ras, jenž je sám aktivován skrze EGF receptory a účastní se tudíž pozitivní zpětnovazebné smyčky (Sizemore *et al.*, 1999). Ektodysplasin skrze NF κ B pozitivně reguluje transkripci amphiregulinu a epigenu v kůži (Voutilainen *et al.*, 2012). Interleukin-13 má u myši týž vliv na transkripci epigenu v horních cestách dýchacích (Taniguchi *et al.*, 2011). Luteinizační hormon a choriogonadotropin zase stimulují expresi amphiregulinu, epigenu a epiregulinu v granulosoých buňkách myších vaječných folikulů (Carletti a Christenson, 2009).



Obr. 13: Aktivace EGF receptorů vede ke spuštění mnoha drah signální transdukce, jejichž cílem jsou jaderné transkripční modifikátory. Upraveno podle Yarden a Sliwkowski, 2001.

4.4 Regulace alternativním sestřihem receptorů

ErbB1 existuje v několika se stříhových variantách. Celodélkový transkript je kódován mRNA o délce 10 nebo 5,8 kb (Xu *et al.*, 1984). Analýza cDNA z různých tkání odhalila existenci forem, které obsahují větší či menší část extracelulární části receptoru, avšak transmembránová i cytosolická část jim zcela chybí (Reiter *et al.*, 2001; Reiter a Maihle, 2003, 1996). Pozoruhodné je, že i přesto jsou některé z nich asociovány s membránou (Reiter a Maihle, 2003). Na rozdíl od nezkráceného ErbB1 receptoru ochotně podstupují proteolytické štěpení metalloproteasou ADAM-17, díky němuž je jejich N-koncová část uvolňována do séra (Reiter a Maihle, 2003; Wilken *et al.*, 2013). V případě 3,0 kb varianty bylo prokázáno, že solubilní forma tohoto transkriptu snižuje tyrosinkinasovou aktivitu plnodélkového receptoru (Basu *et al.*, 1989). Jelikož všechny solubilní formy ErbB1 si ponechávají schopnost vázat ligandy (Reiter a Maihle, 1996; Wilken *et al.*, 2013), je možné, se tak děje prostým vyvázáním dostupného ligandu. Není bez zajímavosti, že u některých typů rakovin byly objeveny aberantní alternativní transkripty ErbB1

(Guillaudeau *et al.*, 2012), jakož i fakt, že obsah solubilní formy tohoto receptoru v séru pacienta je využíván jako indikátor při odhadu účinnosti léčby na něj cílené (shrnutí v Baron *et al.*, 2009).

V případě ErbB2 byla popsána přirozeně se vyskytující solubilní forma bránící aktivaci ostatních ErbB receptorů pojmenovaná Herstatin (Azios *et al.*, 2001; Doherty *et al.*, 1999). V rakovinových buňkách se však, podobně jako u ErbB1, vyskytují též aberantní sestřihové varianty (Omenn *et al.*, 2014; Scott *et al.*, 1993).

ErbB3 receptoru bylo připsáno šestero alternativních transkriptů, z nichž jsou čtyři solubilní (Katoh *et al.*, 1993; Lee a Maihle, 1998). Podrobné zkoumání jednoho z jejich proteinových produktů, p85, ukázalo, že tato sekretovaná forma receptoru je schopna vázat ligand neuregulin 1 a tlumit tak jím zprostředkovanou aktivaci transmembránových ErbB2, 3 a 4 (H. Lee *et al.*, 2001).

V případě ErbB4 byly identifikovány celkem tři sestřihové varianty: plnodělková odpovídající původně objevenému genu (označovaná JM-a CYT-1) (Plowman *et al.*, 1993), dále varianta s deseti chybějícími aminokyselinami v extracelulární části blízko membrány (JM-b) a konečně forma se šestnácti aminokyselinovou delecí v cytosolické části (CYT-2) (Elenius *et al.*, 1997; Sawyer *et al.*, 1998). Ač jsou všechny tyto isoformy schopny aktivace vazbou ligandu, v jiných svých vlastnostech se podstatně liší. Zatímco nezkrácená JM-a CYT-1 forma podstupuje odštěpování ektodomény (viz odst. 4.11), JM-b forma je vůči tomuto štěpení odolná (Elenius *et al.*, 1997). CYT-2 varianta zase ve své C-koncové doméně postrádá vazebné místo pro PI-3 kinasu a není tedy, na rozdíl od ostatních dvou forem, skrze tento protein signální transdukce schopná komunikovat (Elenius *et al.*, 1999; Sawyer *et al.*, 1998). Bylo rovněž prokázáno, že týž ligand může prostřednictvím různých variant ErbB4 spustit různé buněčné odpovědi: nezkrácená forma na přítomnost neuregulinu $\beta 1$ reaguje stimulací cytoprotektivních drah, forma CYT-2 spuštěním chemotaxe (Kainulainen *et al.*, 2000). Isoformy ErbB4 se také vzájemně odlišují co do tkáňové lokalisace (viz odst. 4.1) (Elenius *et al.*, 1999, 1997). Ze všech těchto indicií jasně vysvítá, že v případě ErbB4 hraje alternativní sestřih klíčovou regulační roli.

4.5 Regulace vazbou ligandu

U lidských ErbB receptorů byla identifikována více než jedna desítka ligandů (shrnutí v Singh a Coffey, 2014). Stojí za to si povšimnout, že všechny jsou produkovány ve formě transmembránových prekursorů a z nich poté odštěpovány metalloproteasami skupiny ADAM (shrnutí v Blobel, 2005). Ligandy se vzájemně mohou lišit jednak tkáňovou expresí, druhak specifitou vazby vůči jednotlivým ErbB molekulám (viz níže). Pole působnosti ligandů se *in vivo* často překrývají, což má za následek, že 1) knock-out jediného z nich se nemusí vůbec projevit, neboť ostatní ligandy jej hravě zaskočí (Dahlhoff *et al.*, 2013), 2) odstranění více než jednoho genu zároveň má horší důsledky než součet efektů jejich separátních nulových mutací (Luetteke *et al.*, 1999).

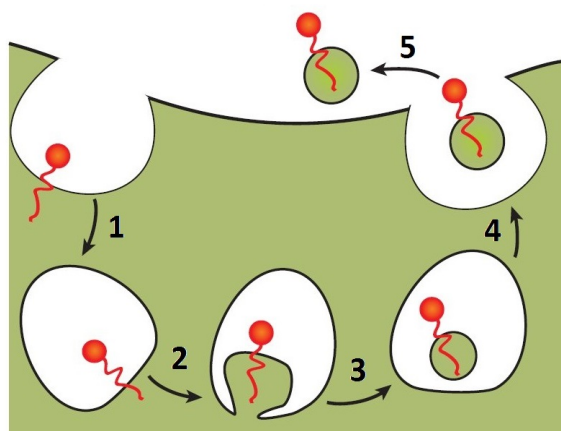
4.5.1 Epidermální růstový faktor (EGF)

Epidermální růstový faktor, ligand specifický pro ErbB1, byl objeven dříve než EGF receptor sám (Cohen, 1962; Cohen a Carpenter, 1975; Jones *et al.*, 1999). Jeho transmembránový prekursor ve své extracelulární části obsahuje 9 EGF-like domén (Bell *et al.*, 1986). Metalloproteasa ADAM-10 z něj odštěpuje celou ektodoménu, avšak biologicky aktivní forma EGF vzniká její další proteolysou a představuje pouze 53 aminokyselin z juxtamembránové části (Bell *et al.*, 1986; Dempsey *et al.*, 1997; Sahin *et al.*, 2004). EGF je produkován v buňkách epitelu vzestupného raménka nefronů (Rall *et al.*, 1985), slinné žlázy a Brunnerových žláz dvanáctníku (Heitz *et al.*, 1978), přičemž je distribuován rovnoměrně po celém povrchu plasmatické membrány (Dempsey *et al.*, 1997). Proteolytické štěpení však probíhá preferenčně na basolaterální straně (Dempsey *et al.*, 1997). EGF může být štěpen také intramembránovou proteasou RHBDL-2 (Adrain *et al.*, 2011).

4.5.2 Transformující růstový faktor α (TGF α)

TGF α se nejsilněji váže na receptor ErbB1 (Jones *et al.*, 1999). Jeho transmembránová forma se u polarisovaných epitelů nachází převážně na basolaterální straně (Dempsey a Coffey, 1994), kde dochází k uvolnění biologicky aktivního proteinu činností proteasy ADAM-17 (Peschon *et al.*, 1998). Jelikož proteolytické štěpení nastává takřka okamžitě, rychlost určující krok produkce tohoto ligandu představuje jeho doprava na cílovou membránu (Dempsey a Coffey, 1994). Po uvolnění ze své transmembránové formy je TGF α promptně vyvázan dostupnými ErbB receptory (Dempsey a Coffey, 1994), čímž je zabráněno jeho difusi ke vzdálenějším buňkám a pole jeho působnosti omezeno na auto- a juxtakrinní signalisaci (Dempsey a Coffey, 1994). Je-li tento regulační děj narušen, např. zablokováním vazebných míst na EGF receptorech protilátkami, může difuze tohoto ligandu do širšího okolí přilákat leukocyty a vést k vytvoření zánětu, což je např. jeden z vedlejších účinků léčby monoklonálními protilátkami cílenými proti ErbB receptorům (Harris *et al.*, 2003). U TGF α byla také zaznamenána extrakrinní signalisace, při níž po dopravení prekursoru na plasmatickou membránu dochází nejprve k jeho endocytose, poté k vypuštění do lumen endocytotického váčku a následnému vyloučení z buňky ve formě exosomu (obr. 14) (Higginbotham *et al.*, 2011).

Obr. 14: Schéma extrakrinní signalisace. Ligand je po dopravení na plasmatickou membránu nejprve endocytován (1, 2), poté se dostává do lumen endosomu jako součást pučícího váčku (3). Multivesikulární tělísko poté splyne s plasmatickou membránou (4) a exosom s ligandem je vyloučen ven z buňky (5). Upraveno podle Singh a Coffey, 2014.



4.5.3 Heparin vážící EGF (HB-EGF)

Tento ligand receptorů ErbB1 a ErbB4 se vyznačuje přítomností heparin vazebné domény v extracelulární části (Higashiyama *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 1999). Účastní se například hojení ran či uhnízdění blastocysty v děloze (Raab *et al.*, 1996; Shirakata *et al.*, 2005). Na rozdíl od TGF α zůstává na plasmatické membráně delší dobu v nerozštěpené podobě, což umožňuje jeho účast na buněčných spojích díky interakci s tetraspaninem (CD9) (Inui *et al.*, 1997). Na uvolňování ektodomény prekursoru HB-EGF se podílí více různých ADAM proteas (Izumi *et al.*, 1998; Sahin *et al.*, 2004). U tohoto ligandu byla poprvé popsána exosomální cesta sekrece (obr. 14) (Higginbotham *et al.*, 2011).

4.5.4 Amphiregulin

Amphiregulin je specifický pro ErbB1, na nějž se váže s podstatně nižší afinitou než EGF (Neelam *et al.*, 1998). Svě jméno obdržel podle pozorování, že v závislosti na buněčném typu může aktivaci svého receptoru buď posilovat, nebo utlumovat (Shoyab *et al.*, 1988). V N-koncové části obsahuje heparin vazebnou doménu umožňující interakci s komponentami extracelulární matrix (Inui *et al.*, 1997). Amphiregulin je ze svého prekursoru uvolňován proteasou ADAM-17 (Sahin *et al.*, 2004). Byl u něj rovněž popsán exosomální způsob sekrece (Higginbotham *et al.*, 2011).

4.5.5 Betacellulin

Betacellulin se váže na ErbB1 i ErbB4 (Riese *et al.*, 1996). Podobně jako EGF je sekretován konstitutivně, a to činností metalloproteasy ADAM-10 (Sanderson *et al.*, 2005). Nejvíce se vyskytuje v pankreatu a tenkém střevě (Seno *et al.*, 1996).

4.5.6 Epiregulin

Tento ligand je schopen aktivovat ErbB1, 3 i 4 (Jones *et al.*, 1999; Shelly *et al.*, 1998). Přestože se na své receptory váže slaběji než např. EGF na ErbB1, má silnější mitogenní účinky (Toyoda *et al.*, 1995). Příčinou je zřejmě skutečnost, že receptor s navázaným epiregulinem nevstupuje do endocytotické dráhy a zůstává tak déle dostupný pro aktivaci tímto ligandem (Shelly *et al.*, 1998). Nalezneme jej zvláště v placentě, leukocytech a keratinocytech (Shirakata *et al.*, 2000; Toyoda *et al.*, 1997).

4.5.7 Epigen

Jedná se o nejnověji popsáný ligand specifický pro ErbB1 (Strachan *et al.*, 2001). Podobně jako epiregulin se na svůj receptor váže slaběji než např. EGF, avšak v endosomu z něj ochotně disociuje a navozuje tak jeho návrat na plasmatickou membránu (Kochupurakkal *et al.*, 2005). To způsobuje, že mitogenní účinky epigenu jsou silnější než u EGF (Kochupurakkal *et al.*, 2005). Přítomnost epigenu je důležitá zvláště pro vývoj mazových žláz a chlupových folikulů (Kochupurakkal *et al.*, 2005; Maier *et al.*, 2011).

4.5.8 Neureguliny

Do této skupiny ligandů patří celkem čtyři proteiny: neuregulin 1, 2, 3 a 4. Nejlépe prozkoumán je neuregulin 1. Díky alternativním sestřihovým možnostem a přítomnosti několika promotorů existuje v mnoha isoformách (viz také odst. 4.6), které se váží na ErbB3 a 4 (Plowman *et al.*, 1993; Sliwkowski *et al.*, 1994). Neuregulin 1 v embryonálním vývoji zprostředkovává komunikaci např. mezi motorickými neurony a kosterními svaly (Sandrock *et al.*, 1997), sensorickými neurony a Schwannovými buňkami, endokardem a myokardem (Meyer a Birchmeier, 1995) a účastní se rovněž vývoje mléčné žlázy (Li *et al.*, 2002). Důležitou roli hraje i při udržování integrity nervové a srdeční tkáně u dospělých jedinců (Gerecke *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 1998).

Neuregulin 2 se rovněž váže na ErbB3 i 4 a kromě EGF-like domény obsahuje též doménu imunoglobulinovou (Carraway *et al.*, 1997). U myši je exprimován v endotelu srdeční komory, v čichových lalocích koncového mozku a v mozečku (Carraway *et al.*, 1997). Neuregulin 3 je specifický pro ErbB4 receptor a je hojně exprimován v nervové soustavě (Zhang *et al.*, 1997). Neuregulin 4 rovněž aktivuje pouze ErbB4, vyskytuje se však především v pankreatu a kosterní svalovině (Harari *et al.*, 1999).

4.6 Regulace alternativním sestřihem ligandu

Jak již bylo zmíněno výše, neuregulin 1 se vyskytuje v mnoha isoformách (shrnuto v Falls, 2003). Některé z nich jsou solubilní, jiné procházející membránou jedenkrát (Holmes *et al.*, 1992) či dvakrát (Wang *et al.*, 2001). Isoformy mohou obsahovat EGF-like doménu buď typu α , nebo β (Holmes *et al.*, 1992). Typ β je silnějším aktivátorem ErbB receptorů, avšak fenotyp myšího knock-outu pro EGF-like α potvrzuje, že při vývoji mléčné žlázy jsou jejich funkce vzájemně nezastupitelné (Li *et al.*, 2002). Sestřihové varianty neuregulinu 1 se dále liší svou N-koncovou sekvencí. Ta může být buď typu I nebo II, jsouc u obou následována Ig-like doménou, nebo typu III, v kterémžto případě zahrnuje na cystein bohatou doménu (Wang *et al.*, 2001). Výsledky mnoha experimentů naznačují, že formy typu I a II podstupují odštěpování ektodomény metalloproteasou ADAM-17 a účastní se tudíž parakrinní signalisace, zatímco u typu III se setkáváme spíše se signalisací juxtakrinní (Leimeroth *et al.*, 2002; Montero *et al.*, 2000).

Několik sestřihových variant se zřejmě vyskytuje také v případě všech ostatních neuregulinů (Chang *et al.*, 1997; Harari *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1997).

4.7 Regulace dostupností ligandu

Všechny ligandy ErbB receptorů jsou produkovány jako transmembránové prekursory³, odštěpování jejich biologicky aktivní N-koncové části, tzv. ektodomény, tedy představuje klíčový regulační krok (shrnuto v Blobel, 2005). Tento úkol zastávají především metalloproteasy ADAM (viz tabulka 1). V případě EGF bylo popsáno jeho štěpení kallikreinovými proteasami (Jørgensen *et al.*, 1994) a dokonce též intramembránovou proteasou Rhomboid 2 (Adrain *et al.*, 2011).

3 Kromě některých solubilních isoform neuregulinů (Holmes *et al.*, 1992).

Produkci ligandů ovlivňují také pseudoproteasy iRhom-1 a 2 (t. j. sekvenčně příbuzné proteasám z rodiny rhomboidů, ale postrádající proteasovou aktivitu), a to tím, že zajišťují dopravu ADAM-17 do Golgiho aparátu a umožňují tak její aktivaci a sekreci ligandů (X. Li *et al.*, 2015). Zároveň se však ukazuje, že iRhom-2 působí jako jakýsi stabilní kofaktor ADAM-17 (Grieve *et al.*, 2017) ovlivňující její proteolytickou specifitu (Maretzky *et al.*, 2013).

Tabulka 1: Metalloproteasy účastníci se odštěpování ektodomén ligandů EGF receptoru. Podle (Izumi *et al.*, 1998; Montero *et al.*, 2000; Sahin *et al.*, 2004; Sahin a Blobel, 2007; Shirakabe *et al.*, 2001)

ADAM-9	HB-EGF
ADAM-10	betacellulin, EGF
ADAM-17	TGF α , HB-EGF, amphiregulin epiregulin, betacellulin, epigen, neureguliny
ADAM-19	neuregulin 1

4.8 Regulace dimerisací

Po vazbě ligandu a vytrčení dimerisačního raménka může ErbB receptor vytvořit dimer s jiným ErbB receptorem vyskytujícím se na téže membráně. Interagovat spolu mohou molekuly stejné, což vede k tvorbě homodimerů, nebo rozdílné, čímž vznikají silněji signalisující heterodimery (Pinkas-Kramarski *et al.*, 1996). Různé kombinace aktivovaných ErbB receptorů přitom přivábí různé efektorové proteiny a vedou k různým buněčným odpovědím, nejsou tedy vzájemně zastupitelné (Olayioye *et al.*, 1999; Riese *et al.*, 1996). Upřednostňovaným dimerisačním partnerem je ErbB2, který signalisaci skrze ostatní ErbB receptory posiluje (Tzahar *et al.*, 1996). Jak již bylo zmíněno v úvodu této sekce, ErbB2 není schopen vázat žádné ligandy (Kochupurakkal *et al.*, 2005). Rozřešení jeho krystalové struktury ukázalo, že má neustále vytrčené dimerisační raménko (Garrett *et al.*, 2003). Tyto dvě skutečnosti dobře vysvětlují jeho ohromný signalisační potenciál: k vytvoření dimeru s ErbB2 stačí vazba pouze jedné molekuly ligandu (Citri *et al.*, 2003). Vznik homodimerů ErbB2, které by signalisovaly i bez přítomnosti ligandu, by však pro organismus představoval velké nebezpečí, a proto je mu *in vivo* bráněno nejspíš vzájemnou elektrostatickou repulzí ramének (Garrett *et al.*, 2003). Byla také popsána asymetrická homodimerisace ErbB2 způsobem „hlava k ocasu“, což může představovat další způsob, jak nežádoucí aktivaci tohoto receptoru zabránit (Hu *et al.*, 2015). Homodimer ErbB3 zase není schopen předat signál přes plasmatickou membránu z důvodu nefunkční tyrosinkinasové domény (Guy *et al.*, 1994; Pinkas-Kramarski *et al.*, 1996). Čtyři lidské ErbB receptory tedy skýtají paletu celkem osmi různých dimerů, které se mohou podílet na modulaci signálu (Tzahar *et al.*, 1996). Kuriosně se z nich jako nejschopnější *in vitro* ukázal být právě vzájemně se doplňující heterodimer ErbB2-ErbB3 (Pinkas-Kramarski *et al.*, 1996; Tzahar *et al.*, 1996).

4.9 Regulace dostupností receptoru

ErbB receptory se u polarizovaných epitelů vyskytují na basolaterální membráně, čímž je zabráněno jejich nežádoucí aktivaci růstovými faktory produkovanými do lumen (Vermeer *et al.*, 2003). Nicméně

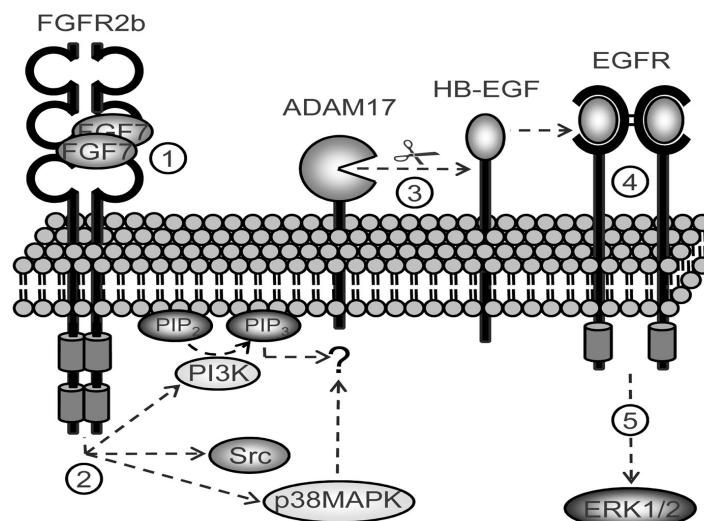
menšinová populace receptorů na apikální straně preferenčně spouští jiné signální kaskády a je také pomaleji endocytována (Amsler a Kuwada, 1999). Za basolaterální lokalizaci EGF receptorů odpovídají proteiny CASK, mLIN-7 a X11 α (neboli Mint-1), homology proteinů LIN-2, 7 a 10 u háďátka (Borg *et al.*, 1998). Míru aktivace ErbB molekul také může ovlivnit jejich přednostní dopravení do kaveol, kde snáze narazí na dimerizačního partnera nebo proteiny signální transdukce (Mineo *et al.*, 1996).

Dimer aktivovaných receptorů s navázanými ligandy záhy podstupuje internalizaci do endocytotických váčků (Haigler *et al.*, 1979). Jeho další osud závisí na několika faktorech. Prvním je typ vytvořeného dimeru. Zatímco homodimer ErbB1 prakticky vždycky skončí v lysosomech, homodimery ErbB3 a heterodimery obsahující ErbB2 jsou navraceny („recyklovány“) na plasmatickou membránu (Baulida *et al.*, 1996; Waterman *et al.*, 1998). Dalším faktorem je typ navázaného ligandu. Vazba EGF na ErbB1 je odolná vůči kyselému pH v endosomech, komplex ligand-receptor se tedy nerozpadá a před MVB putuje do lysosomů, kde je degradován (Herbst *et al.*, 1994). Naproti tomu TGF α od svého receptoru v endosomu disociuje a, nastoupiv sám degradativní cestu, umožní mu návrat na plasmatickou membránu (Korc a Finman, 1989). Stejně jako TGF α fungují i epiregulin a epigen (Kochupurakkal *et al.*, 2005; Shelly *et al.*, 1998). Internalizaci ErbB receptorů a jejich cílení do lysosomů posiluje také činnost ubikvitinligas: c-Cbl interaguje s ErbB1 (Levkowitz *et al.*, 1998), CHIP s ErbB2 (Xu *et al.*, 2002). Některé experimenty naznačují, že ErbB1 může být z MVB dopravován do exosomů a v nich podstupovat proteolytické štěpení (Sanderson *et al.*, 2008).

4.10 Regulace skrz ostatní signální kaskády

K aktivaci ErbB receptorů může docházet také v důsledku spuštění signalisace přes jiné receptory. V tomto případě hovoříme o tzv. signálu třikrát procházejícím membránou (triple membrane-passing signal, TMPS) (Prenzel *et al.*, 1999). Přijetí signálu z vnějšího prostředí vede k aktivaci příslušné ADAM metalloproteasy, ta z prekursoru ligandu EGF receptoru odštěpí jeho ektodoménu, která se naváže na ErbB receptor, jenž je tímto aktivován a standardním způsobem předá signál dovnitř buňky (obr. 15) ((Prenzel *et al.*, 1999). Tento proces byl dosud popsán u HB-EGF, TGF α , amphiregulinu a epiregulinu, kde v roli metalloproteasy vystupuje ADAM-17 (Maretzky *et al.*, 2013, 2011). Pro transaktivaci ErbB receptorů jsou naprosto klíčové iRhomy, které regulují dopravu ADAM-17 do Golgiho aparátu (viz odst. 4.7) (X. Li *et al.*, 2015) i její aktivitu a substrátovou specifitu na plasmatické membráně (Grieve *et al.*, 2017; Maretzky *et al.*, 2013).

Receptory spřažené s G-proteiny nebo cytokinové receptory mohou zároveň vyvolat fosforylaci proteinů ErbB, a to nezávisle na jejich vlastní kinasové aktivitě. Děje se tak například prostřednictvím Src nebo Jak kinas (Andreev *et al.*, 2001; Yamauchi *et al.*, 1997).



Obr. 15: Schéma transaktivace ErbB receptoru. Při tomto ději signál přes membránu prochází celkem třikrát. 1 – vazba ligandu na jiný receptor (zde receptor pro fibroblastový růstový faktor, FGFR); 2 – fosforylace substrátů FGF receptoru a aktivace ADAM-17; 3 – uvolnění biologicky aktivní části prekursoru HB-EGF; 4 – aktivace ErbB1 receptoru vazbou HB-EGF; 5 – fosforylace substrátů ErbB1 receptoru. Převzato z Maretzky *et al.*, 2011.

4.11 Regulace odštěpováním ektodomény receptoru

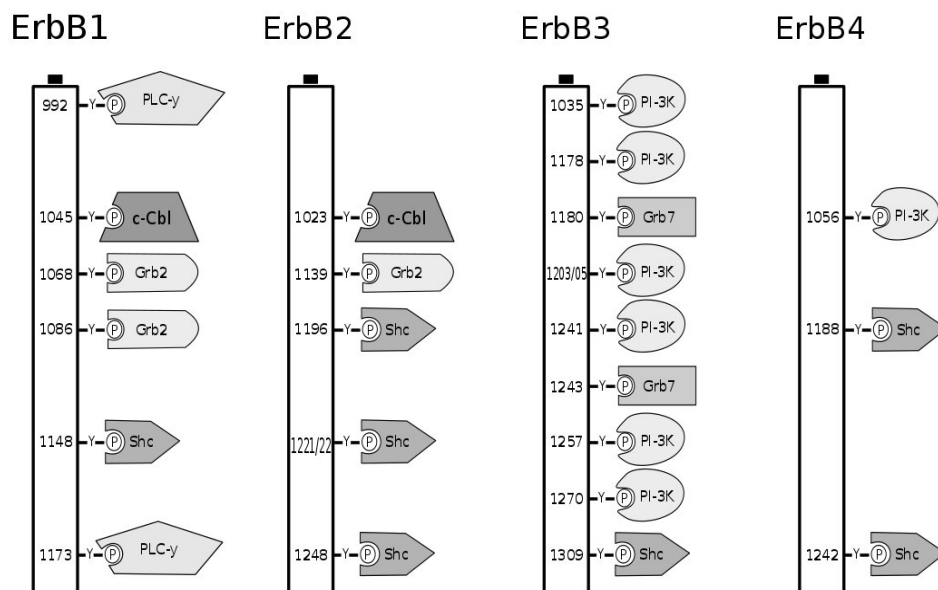
Podobně jako jejich ligandy podstupují též některé isoformy ErbB receptorů odštěpování ektodomény za účasti ADAM proteas. Plnodélkový ErbB1 je vůči tomuto štěpení odolný (Vecchi *et al.*, 1996), jeho isoforma vznikající z 3 kb transkriptu jako transmembránový protein je však substrátem ADAM-17 (Wilken *et al.*, 2013). Uvolňování ektodomény ErbB2 za účasti ADAM-10 bylo popsáno u buněk rakoviny prsu (Liu *et al.*, 2006; Zabrecky *et al.*, 1991). Z isoform ErbB4 tomuto procesu podléhá pouze JM-a, která je specificky štěpena ADAM-17 (Rio *et al.*, 2000). Pozoruhodné je, že v membráně pozůstalý zbytek receptoru může být dále štěpen gama-sekretasou a poté jako solubilní molekula dopraven do jádra (Ni *et al.*, 2001), kde spolu s ostatními proteiny ovlivňuje transkripci genů (Komuro *et al.*, 2003).

Jiným překvapujícím zjištěním bylo, že při silné nadprodukci může být ErbB1 substrátem pro intramembránovou proteasu RHBDL-2 (Rhomboid-like protein 2) (Liao a Carpenter, 2012). Jestli se tento mechanismus skutečně uplatňuje *in vivo* však není známo.

4.12 Regulace fosforylací tyrosinových zbytků

Fosforylací jednotlivých tyrosinových zbytků v cytosolických doménách ErbB receptorů vznikají vazebná místa pro mnoho proteinů účastnících se transdukce signálu (obr. 16) (shrnuto v Olayioye *et al.*, 2000). Do jaké míry však jsou tyto zbytky potřebné pro vypůsobení té které buněčné odpovědi nebo vzájemně zastupitelné není dosud u všech ErbB molekul jednoznačně prokázáno. V případě ErbB2 byly čtyři z pěti fosforylovatelných tyrosinů vůči Ras/MAP kinasové dráze identifikovány jako aktivační a vzájemně zastupitelné, zbylý tyrosin pak jako inhibiční (Dankort *et al.*, 1997). U ErbB1 bylo prokázáno, že role jednotlivých tyrosinových zbytků se při zapínání různých buněčných odpovědí mohou lišit (Yamaoka *et al.*,

2011) a že jejich přítomnost je klíčová pro efektivní internalisaci receptoru s navázaným ligandem (Sorkin *et al.*, 1992, 1991).



Obr. 16: Jednotlivé fosforylované tyrosiny v C-koncových částech ErbB receptorů představují vazebná místa pro různé proteiny signálních drah. PI-3K, fosfoinositidkinasa. Překresleno podle Olayioye *et al.*, 2000.

4.13 Onemocnění způsobená dysregulací ErbB receptorů

Jelikož ErbB receptory ovlivňují děje jako buněčné dělení, přežití nebo migraci, je nasnadě, že vymkne-li se jejich regulace kontrole, může dojít k rozvoji onemocnění. Zvýšená exprese ErbB receptorů, přítomnost nejrozličnějších mutantních variant nebo nadprodukce jejich ligandů byla zaznamenána u značného množství nádorů (tabulka 2) (shrnuje Sibilio *et al.*, 2007). Snížená exprese ErbB4 a neuregulinu 1, molekul nezbytných pro správný vývoj a udržování homeostasy srdce, může vést ke vzniku kardiovaskulárních onemocnění (Lemmens *et al.*, 2007). Dysregulace ErbB4 a neuregulinu 1 je zase spojována s rozvojem schizofrenie (Banerjee *et al.*, 2010). Nadprodukce ErbB1 mimo basální vrstvu kůže vede ke vzniku lupénky (Nanney *et al.*, 1986).

Tabulka 2 (pokračuje na další straně): Příspěvek dysregulace ErbB receptorů a jejich ligandů k rozvoji mnoha typů rakovin. Převzato z Yarden a Sliwkowski, 2001.

Molekula	Forma dysregulace	Druh rakoviny	Poznámka
TGF α	overexprese	plic, tlustého střeva, vaječníku	prognosu zhoršuje koexprese s ErbB1
neuregulin 1	overexprese	adenokarcinom prsu	
ErbB1	overexprese	hlavy, krku, prsu, ledvin, močového měchýře, prostaty; nemalobuněčný karcinom plic, gliomy	overexprimován ve 40 % gliomů; u rakoviny prostaty, močového měchýře a nemalobuněčného karcinomu plic může sloužit jako prognostický marker

Tabulka 2 – pokračování z předchozí strany

ErbB1	mutace	plic, vaječníku, prsu; gliomy	částečná delece v extracelulární části vede ke vzniku konstitutivně aktivního receptoru
ErbB2	overexprese	prsu, plic, pankreatu, tlustého střeva, endometria	amplifikace genu nastává u 15–30 % invazivních duktálních nádorů prsu
ErbB3	overexprese	karcinom dlaždicového epitelu ústní dutiny	
ErbB4	snížená exprese	prsu, ledvin	
	exprese	dětský medulloblastom	

4.14 Léčebné prostředky používané v boji proti onemocněním souvisejícím s ErbB receptory

Jednou ze strategií jak zamezit nadměrnou aktivaci ErbB receptorů je vytvořit monoklonální protilátku blokující vazebné místo pro ligand. Kromě kompetitivní inhibice podporují navázané protilátky internalisaci receptoru, případně též umožní destrukci buňky komplementem nebo cytotoxickými T-lymfocyty (Kimura *et al.*, 2007; Sliwkowski *et al.*, 1999; Sunada *et al.*, 1986). V současné době jsou s větším či menším úspěchem používány cetuximab a panitumumab při léčbě rakoviny tlustého střeva (Petrelli *et al.*, 2011), trastuzumab a pertuzumab při léčbě rakoviny prsu (Slamon *et al.*, 2001; Traynor, 2012). Aktivaci ErbB receptorů lze také tlumit podáním inhibitorů jejich kinasové aktivity (shrnutí v Levitzki a Gazit, 1995). Jedná se o analoga ATP, která se reversibilně či ireversibilně váží do aktivního místa tyrosinkinasové domény (Posner *et al.*, 1994; Uehara *et al.*, 1989). Oproti monoklonálním protilátkám cíleným na extracelulární doménu mají tu výhodu, že účinkují i na mutantní, zkrácené formy ErbB receptorů (Seshacharyulu *et al.*, 2012). Klinickými testy prošel např. gefitinib, erlotinib nebo lapatinib (shrnutí v Seshacharyulu *et al.*, 2012). Jak monoklonální protilátky, tak inhibitory tyrosinkinasové domény však vykazují nezanedbatelné vedlejší účinky (shrnutí v Widakowich *et al.*, 2007). Jako další možný terapeutický cíl byly také záhy vytipovány metalloproteasy ADAM, účastníci se produkce ligandů, jež jsou u některých typů rakovin rovněž dysregulovány (Fridman *et al.*, 2007). Tento přístup se však nesetkal s velkým úspěchem, neboť vyvinuté léky měly toxické účinky (shrnutí v Edwards *et al.*, 2008), a to z důvodu velké podobnosti aktivních míst mnoha paralogů ADAM proteas kódovaných v lidském genomu a jejich rozmanitých funkcí. Specifičtější cíl léčby by mohl představovat iRhom, který je esenciální pouze pro ADAM-17, ovšem mechanismus jeho působení a možnost jeho inhibice jsou zatím zcela neznámé.

5 Závěr

Sledování vývoje regulačních mechanismů aktivace EGF receptorů ukazuje, že jejich komplexita roste se zvyšující se složitostí organismu. Na základě informací shromážděných na předchozích stránkách se mi podařilo vystopovat několik zřetelných trendů, které se při tomto procesu uplatnily.

1. Zmnožení (multiplikace): Zatímco u háďátka signalisace probíhá prostřednictvím jednoho EGF receptoru s jedním ligandem, u octomilky jsou již k dispozici ligandy čtyři. U člověka počet EGF receptorů vzrůstá na čtyři a počet ligandů na jedenáct. Roste tudíž i počet kvalitativně odlišných dimerů, jež spolu mohou aktivované receptory vytvářet.

2. Rozrůznění (diversifikace): Větší počet ligandů i receptorů umožňuje efektivní rozdělení jejich rolí. U háďátka aktivace EGF receptoru probíhá vždy prostřednictvím jediného ligandu, modulace síly signálu se tedy musí odehrávat ovlivněním jeho množství, ať už na transkripční, posttranslační či postsekreční úrovni. Mezi ligandy octomilky nalezneme silné i slabé aktivátory EGF receptoru, které se navíc liší svou tkáňovou lokalizací. U člověka se k rozrůznění vlastností a tkáňové distribuce ligandů přidává též jejich rozdílná specifita pro jednotlivé typy EGF receptorů (a *vice versa* z pohledu receptorů). Za extrémní příklad diversifikace rolí lze považovat receptory ErbB2 a ErbB3. Zatímco první jmenovaný není schopen vazby ligandu, ale má zachovanou tyrosinkinsovou aktivitu, ErbB3 ligandy vázat dovede, avšak tyrosinkinsová doména u něj funkční není. Tyto dva receptory, ač jako jednotlivci transdukce signálu neschopní, se ve svých omezeních vzájemně doplňují a vytvářejí spolu silně signalisující heterodimer.

3. Zachování (konservace): Některé regulační mechanismy zůstávají zachovány u všech analysovaných organismů, např. endocytosa receptoru nebo řízení jeho lokalisace. Za pozornost také stojí, že role proteinů z rodiny rhomboidů jakožto modulátorů signalisace přes EGF receptor zůstává zachována napříč fylogenetickým spektrem organismů. U háďátka se podílejí na sekvenčním zesilování signálu, u octomilky plní funkci hlavních regulátorů produkce ligandů. V případě člověka (savců) byly v roli producentů solubilních forem ligandů vystřídány metalloproteasami ADAM, avšak ukazuje se, že iRhomy tento proces kontrolují právě regulací proteinů ADAM.

4. Spolupráce (kooperace): Úlohy jednotlivých ligandů se *in vivo* často překrývají, což je ve zdánlivém rozporu s výše zmíněnou diversifikací. Tento trend však souvisí se zachováním robustnosti signalizačního systému. V případě poškození genu pro některý z ligandů totiž jeho funkci mohou ostatní hravě vykompenzovat.

6 Seznam použité literatury

(* sekundární zdroj)

- Adrain, C., Strisovsky, K., Zettl, M., Hu, L., Lemberg, M. K., Freeman, M., 2011. Mammalian EGF receptor activation by the rhomboid protease RHBDL2. *EMBO Rep.* 12, 421–427. doi:10.1038/embor.2011.50
- Algrain, M., Turunen, O., Vaheiri, A., 1993. Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. *J. Cell Biol.* 120, 129–139.
- Alvarado, D., Rice, A. H., Duffy, J.B., 2004. Bipartite inhibition of *Drosophila* epidermal growth factor receptor by the extracellular and transmembrane domains of Kekk1. *Genetics* 167, 187–202.
- Amsler, K., Kuwada, S.K., 1999. Membrane receptor location defines receptor interaction with signaling proteins in a polarized epithelium. *Am. J. Physiol. – Cell Physiol.* 276, C91–C101.
- Anderson, D., Koch, C. A., Grey, L., Ellis, C., Moran, M. F., Pawson, T., 1990. Binding of SH2 domains of phospholipase C- γ , GAP, and Src to activated growth factor receptors. *Science* 250, 979–982.
- Andreev, J., Galisteo, M. L., Kranenburg, O., Logan, S. K., Chiu, E. S., Okigaki, M., Cary, L. A., Moolenaar, W. H., Schlessinger, J., 2001. Src and Pyk2 mediate G-protein-coupled receptor activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) but are not required for coupling to the mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling cascade. *J. Biol. Chem.* 276, 20130–20135. doi:10.1074/jbc.M102307200
- Aroian, R. V., Koga, M., Mendel, J. E., Ohshima, Y., Sternberg, P. W., 1990. The *let-23* gene necessary for *Caenorhabditis elegans* vulval induction encodes a tyrosine kinase of the EGF receptor subfamily. *Nature* 348, 693–699. doi:10.1038/348693a0
- Azios, N. G., Romero, F. J., Denton, M. C., Doherty, J. K., Clinton, G. M., 2001. Expression of herstatin, an autoinhibitor of HER-2/neu, inhibits transactivation of HER-3 by HER-2 and blocks EGF activation of the EGF receptor. *Oncogene* 20, 5199–5209. doi:10.1038/sj.onc.1204555
- Bai, J., Chiu, W., Wang, J., Tzeng, T., Perrimon, N., Hsu, J., 2001. The cell adhesion molecule Echinoid defines a new pathway that antagonizes the *Drosophila* EGF receptor signaling pathway. *Development* 128, 591–601.
- Banerjee, A., MacDonald, M. L., Borgmann-Winter, K. E., Hahn, C.-G., 2010. Neuregulin 1 – ErbB4 pathway in schizophrenia: From genes to an interactome. *Brain Res. Bull.* 83, 132–139. doi:10.1016/j.brainresbull.2010.04.011
- * Baron, A. T., Wilken, J. A., Haggstrom, D. E., Goodrich, S. T., Maihle, N. J., 2009. Clinical implementation of soluble EGFR (sEGFR) as a theragnostic serum biomarker of breast, lung and ovarian cancer. *IDrugs Investig. Drugs J.* 12, 302–308.
- Basu, A., Raghunath, M., Bishayee, S., Das, M., 1989. Inhibition of tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor (EGF) receptor by a truncated receptor form that binds to EGF: role for interreceptor interaction in kinase regulation. *Mol. Cell. Biol.* 9, 671–677.
- Baulida, J., Kraus, M. H., Alimandi, M., Fiore, P. P. D., Carpenter, G., 1996. All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J. Biol. Chem.* 271, 5251–5257. doi:10.1074/jbc.271.9.5251
- Bell, G. I., Fong, N. M., Stempien, M. M., Wormsted, M. A., Caput, D., Ku, L. L., Urdea, M. S., Rall, L. B., Sanchez-Pescador, R., 1986. Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression *in vitro* and gene organization. *Nucleic Acids Res.* 14, 8427–8446.
- Bertics, P. J., Gill, G. N., 1985. Self-phosphorylation enhances the protein-tyrosine kinase activity of the Epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 260, 14642–14647.
- * Blobel, C. P., 2005. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 32–43. doi:10.1038/nrm1548
- Booy, E. P., Henson, E. S., Gibson, S. B., 2011. Epidermal growth factor regulates Mcl-1 expression through the MAPK-Elk-1 signalling pathway contributing to cell survival in breast cancer. *Oncogene* 30, 2367–2378. doi:10.1038/ncr.2010.616
- Borg, Å., Baldetorp, B., Fernö, M., Killander, D., Olsson, H., Ryden, S., Sigurdsson, H., 1994. ErbB2 amplification is associated with tamoxifen resistance in steroid-receptor positive breast cancer. *Cancer Lett.* 81, 137–144. doi:10.1016/0304-3835(94)90194-5
- Borg, J.-P., Straight, S. W., Kaech, S. M., Taddéo-Borg, M. de, Kroon, D. E., Karnak, D., Turner, R. S., Kim,

- S. K., Margolis, B., 1998. Identification of an evolutionarily conserved heterotrimeric protein complex involved in protein targeting. *J. Biol. Chem.* 273, 31633–31636. doi:10.1074/jbc.273.48.31633
- Brown, K. E., Kerr, M., Freeman, M., 2007. The EGFR ligands Spitz and Keren act cooperatively in the *Drosophila* eye. *Dev. Biol.* 307, 105–113. doi:10.1016/j.ydbio.2007.04.025
- Brunner, D., Oellers, N., Szabad, J., Biggs, W. H., Zipursky, S. L., Hafen, E., 1994. A gain-of-function mutation in *Drosophila* MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Cell* 76, 875–888. doi:10.1016/0092-8674(94)90362-X
- Burdine, R. D., Branda, C. S., Stern, M. J., 1998. Egl-17 (FGF) expression coordinates the attraction of the migrating sex myoblasts with vulval induction in *C. elegans*. *Development* 125, 1083–1093.
- Burke, P., Schooler, K., Wiley, H. S., 2001. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking. *Mol. Biol. Cell* 12, 1897–1910.
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., al, et, 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Sci. Wash.* 282, 1318–21.
- Carletti, M. Z., Christenson, L. K., 2009. rapid effects of luteinizing hormone on gene expression in the mural granulosa cells of mouse periovulatory follicles. *Reprod. Camb. Engl.* 137, 843–855. doi:10.1530/REP-08-0457
- Carraway, K. L., Weber, J. L., Unger, M. J., Ledesma, J., Yu, N., Gassmann, M., Lai, C., 1997. Neuregulin 2, a new ligand of ErbB3/ErbB4 receptor tyrosine kinases. *Nature* 387, 512–516. doi:10.1038/387512a0
- Casci, T., Vinós, J., Freeman, M., 1999. Sprouty, an intracellular inhibitor of ras signaling. *Cell* 96, 655–665. doi:10.1016/S0092-8674(00)80576-0
- Ceol, C. J., Horvitz, H. R., 2004. A new class of *C. elegans* synMuv genes implicates a Tip60/NuA4-like HAT complex as a negative regulator of ras signaling. *Dev. Cell* 6, 563–576. doi:10.1016/S1534-5807(04)00065-6
- Chang, H., Riese, D. J., Gilbert, W., Stern, D. F., McMahan, U. J., 1997. Ligands for ErbB family receptors encoded by a neuregulin-like gene. *Nature* 387, 509–512. doi:10.1038/387509a0
- Chang, W.-L., Liou, W., Pen, H.-C., Chou, H.-Y., Chang, Y.-W., Li, W.-H., Chiang, W., Pai, L.-M., 2008. The gradient of Gurken, a long-range morphogen, is directly regulated by Cbl-mediated endocytosis. *Development* 135, 1923–1933. doi:10.1242/dev.017103
- Citri, A., Skaria, K. B., Yarden, Y., 2003. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp. Cell Res.* 284, 54–65. doi:10.1016/S0014-4827(02)00101-5
- Cohen, S., 1962. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.* 237, 1555–1562.
- Cohen, S., Carpenter, G., 1975. Human epidermal growth factor: isolation and chemical and biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 1317–1321.
- Cohen, S., Carpenter, G., King, L., 1980. Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J. Biol. Chem.* 255, 4834–4842.
- Cohen, S., Fava, R. A., Sawyer, S. T., 1982. Purification and characterization of epidermal growth factor receptor/protein kinase from normal mouse liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 6237–6241.
- Cohen, S., Ushiro, H., Stoscheck, C., Chinkers, M., 1982. A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 257, 1523–1531.
- Dahlhoff, M., Schäfer, M., Wolf, E., Schneider, M. R., 2013. Genetic deletion of the EGFR ligand epigen does not affect mouse embryonic development and tissue homeostasis. *Exp. Cell Res.* 319, 529–535. doi:10.1016/j.yexcr.2012.11.001
- Dankort, D. L., Wang, Z., Blackmore, V., Moran, M. F., Muller, W. J., 1997. Distinct tyrosine autophosphorylation sites negatively and positively modulate neu-mediated transformation. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5410–5425.
- Davison, E. M., Harrison, M. M., Walhout, A. J. M., Vidal, M., Horvitz, H.R., 2005. *lin-8*, which antagonizes *Caenorhabditis elegans* Ras-mediated vulval induction, encodes a novel nuclear protein that interacts with the LIN-35 Rb protein. *Genetics* 171, 1017–1031. doi:10.1534/genetics.104.034173
- Dempsey, P. J., Coffey, R. J., 1994. Basolateral targeting and efficient consumption of transforming growth factor-alpha when expressed in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* 269, 16878–16889.
- Dempsey, P. J., Meise, K. S., Yoshitake, Y., Nishikawa, K., Coffey, R. J., 1997. Apical enrichment of human

- EGF precursor in Madin-Darby canine kidney cells involves preferential basolateral ectodomain cleavage sensitive to a metalloprotease inhibitor. *J. Cell Biol.* 138, 747–758.
- Doherty, J. K., Bond, C., Jardim, A., Adelman, J. P., Clinton, G. M., 1999. The HER-2/neu receptor tyrosine kinase gene encodes a secreted autoinhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 10869–10874.
- Domínguez, M., Wasserman, J. D., Freeman, M., 1998. Multiple functions of the EGF receptor in *Drosophila* eye development. *Curr. Biol.* 8, 1039–1048. doi:10.1016/S0960-9822(98)70441-5
- Dutt, A., Canevascini, S., Froehli-Hoier, E., Hajnal, A., 2004. EGF signal propagation during *C. elegans* vulval development mediated by ROM-1 Rhomboid. *PLoS Biol.* 2. doi:10.1371/journal.pbio.0020334
- * Edwards, D. R., Handsley, M. M., Pennington, C. J., 2008. The ADAM metalloproteinases. *Mol. Aspects Med., Metzincin Metalloproteinases* 29, 258–289. doi:10.1016/j.mam.2008.08.001
- Elenius, K., Choi, C. J., Subroto, P., Santiestevan, E., Nishi, E., Klagsbrun, M., 1999. Characterization of a naturally occurring ErbB4 isoform that does not bind or activate phosphatidylinositol 3-kinase. *Publ. Online* 23 April 1999 Doi101038sjonc1202612 18. doi:10.1038/sj.onc.1202612
- Elenius, K., Corfas, G., Paul, S., Choi, C. J., Rio, C., Plowman, G. D., Klagsbrun, M., 1997. A Novel juxtamembrane domain isoform of HER4/ErbB4 isoform-specific tissue distribution and differential processing in response to phorbol ester. *J. Biol. Chem.* 272, 26761–26768. doi:10.1074/jbc.272.42.26761
- * Escobar-Restrepo, J. M., Hajnal, A., 2014. An intimate look at Let-23 EGFR trafficking in the vulval cells of live *C. elegans* larvae. *Worm* 3, e965605. doi:10.4161/21624046.2014.965605
- * Falls, D. L., 2003. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies. *Exp. Cell Res.* 284, 14–30. doi:10.1016/S0014-4827(02)00102-7
- Ferguson, E. L., Horvitz, H. R., 1989. The Multivulva phenotype of certain *Caenorhabditis elegans* mutants results from defects in two functionally redundant pathways. *Genetics* 123, 109–121.
- Ferguson, E. L., Horvitz, H. R., 1985. Identification and characterization of 22 genes that affect the vulval cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 110, 17–72.
- Ferguson, K. M., Berger, M. B., Mendrola, J. M., Cho, H.-S., Leahy, D. J., Lemmon, M. A., 2003. EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol. Cell* 11, 507–517. doi:10.1016/S1097-2765(03)00047-9
- Flibotte, S., Kim, B. R., Van de Laar, E., Brown, L., Moghal, N., 2016. The SWI/SNF chromatin remodeling complex exerts both negative and positive control over Let-23/EGFR-dependent vulval induction in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 415, 46–63. doi:10.1016/j.ydbio.2016.05.009
- Freeman, M., 1996. Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell* 87, 651–660. doi:10.1016/S0092-8674(00)81385-9
- Fridman, J. S., Caulder, E., Hansbury, M., Liu, X., Yang, G., Wang, Q., Lo, Y., Zhou, B.-B., Pan, M., Thomas, S. M., Grandis, J. R., Zhuo, J., Yao, W., Newton, R. C., Friedman, S. M., Scherle, P. A., Vaddi, K., 2007. Selective inhibition of ADAM metalloproteases as a novel approach for modulating ErbB pathways in cancer. *Clin. Cancer Res.* 13, 1892–1902. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2116
- Garrett, T. P. J., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Kofler, M., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., Ward, C. W., 2003. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol. Cell* 11, 495–505. doi:10.1016/S1097-2765(03)00048-0
- Garrett, T. P. J., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Zhu, H.-J., Walker, F., Frenkel, M. J., Hoyne, P. A., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., Ward, C. W., 2002. Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor α . *Cell* 110, 763–773. doi:10.1016/S0092-8674(02)00940-6
- Gerecke, K. M., Wyss, J. M., Karavanova, I., Buonanno, A., Carroll, S. L., 2001. ErbB transmembrane tyrosine kinase receptors are differentially expressed throughout the adult rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* 433, 86–100.
- Ghiglione, C., Amundadottir, L., Andresdottir, M., Bilder, D., Diamonti, J. A., Noselli, S., Perrimon, N., Carraway, K. L., 2003. Mechanism of inhibition of the *Drosophila* and mammalian EGF receptors by the transmembrane protein Kekk1. *Development* 130, 4483–4493. doi:10.1242/dev.00617
- Ghiglione, C., Bach, E. A., Paraiso, Y., Carraway, K. L., Noselli, S., Perrimon, N., 2002. Mechanism of activation of the *Drosophila* EGF receptor by the TGF α ligand Gurken during oogenesis. *Development* 129, 175–186.

- Ghiglione, C., Carraway, K. L., Amundadottir, L. T., Boswell, R. E., Perrimon, N., Duffy, J. B., 1999. The transmembrane molecule Kekk-1 acts in a feedback loop to negatively regulate the activity of the *Drosophila* EGF receptor during oogenesis. *Cell* 96, 847–856. doi:10.1016/S0092-8674(00)80594-2
- Golembo, M., Schweitzer, R., Freeman, M., Shilo, B. Z., 1996. Argos transcription is induced by the *Drosophila* EGF receptor pathway to form an inhibitory feedback loop. *Development* 122, 223–230.
- Grieve, A. G., Xu, H., Künzel, U., Bambrough, P., Sieber, B., Freeman, M., 2017. Phosphorylation of iRhom2 at the plasma membrane controls mammalian TACE-dependent inflammatory and growth factor signalling. *eLife* 6. doi:10.7554/eLife.23968
- Guichard, A., Roark, M., Ronshaugen, M., Bier, E., 2000. Brother of Rhomboid, a rhomboid-related gene expressed during early *Drosophila* oogenesis, promotes EGFR/MAPK Signaling. *Dev. Biol.* 226, 255–266. doi:10.1006/dbio.2000.9851
- Guillaudeau, A., Durand, K., Bessette, B., Chaunavel, A., Pommepuy, I., Progetti, F., Robert, S., Caire, F., Rabinovitch-Chable, H., Labrousse, F., 2012. EGFR soluble isoforms and their transcripts are expressed in meningiomas. *PLoS ONE* 7. doi:10.1371/journal.pone.0037204
- Guy, P. M., Platko, J. V., Cantley, L. C., Cerione, R. A., Carraway, K. L., 1994. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 8132–8136.
- Haag, A., Gutierrez, P., Bühler, A., Walser, M., Yang, Q., Langouët, M., Kradolfer, D., Fröhli, E., Herrmann, C. J., Hajnal, A., Escobar-Restrepo, J. M., 2014. An *in vivo* EGF receptor localization screen in *C. elegans* identifies the Ezrin homolog Erm-1 as a temporal regulator of signaling. *PLoS Genet.* 10. doi:10.1371/journal.pgen.1004341
- Haigler, H. T., McKanna, J. A., Cohen, S., 1979. Direct visualization of the binding and internalization of a ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *J. Cell Biol.* 81, 382–395. doi:10.1083/jcb.81.2.382
- Hajnal, A., Whitfield, C. W., Kim, S. K., 1997. Inhibition of *Caenorhabditis elegans* vulval induction by GAP-1 and by Let-23 receptor tyrosine kinase. *Genes Dev.* 11, 2715–2728.
- Harari, D., Tzahar, E., Romano, J., Shelly, M., Pierce, J. H., Andrews, G. C., Yarden, Y., 1999. Neuregulin 4: a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 18, 2681–2689. doi:10.1038/sj.onc.1202631
- Harris, R. C., Chung, E., Coffey, R. J., 2003. EGF receptor ligands. *Exp. Cell Res.* 284, 2–13. doi:10.1016/S0014-4827(02)00105-2
- Heitz, P. U., Kasper, M., van Noorden, S., Polak, J. M., Gregory, H., Pearse, A. G., 1978. Immunohistochemical localisation of urogastrone to human duodenal and submandibular glands. *Gut* 19, 408–413.
- Herbst, J. J., Opresko, L. K., Walsh, B. J., Lauffenburger, D. A., Wiley, H. S., 1994. Regulation of postendocytic trafficking of the epidermal growth factor receptor through endosomal retention. *J. Biol. Chem.* 269, 12865–12873.
- Herman, R. K., 1978. Crossover suppressors and balanced recessive lethals in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 88, 49–65.
- Higashiyama, S., Lau, K., Besner, G. E., Abraham, J. A., Klagsbrun, M., 1992. Structure of heparin-binding EGF-like growth factor. Multiple forms, primary structure, and glycosylation of the mature protein. *J. Biol. Chem.* 267, 6205–6212.
- Higginbotham, J. N., Beckler, M. D., Gephart, J. D., Franklin, J. L., Bogatcheva, G., Kremers, G.-J., Piston, D. W., Ayers, G. D., McConnell, R. E., Tyska, M. J., Coffey, R. J., 2011. Amphiregulin exosomes increase cancer cell invasion. *Curr. Biol. CB* 21, 779–786. doi:10.1016/j.cub.2011.03.043
- Hill, R. J., Sternberg, P. W., 1992. The gene *lin-3* encodes an inductive signal for vulval development in *C. elegans*. *Nature* 358, 470–476. doi:10.1038/358470a0
- Holmes, W. E., Sliwkowski, M. X., Akita, R. W., Henzel, W. J., Lee, J., Park, J. W., Yansura, D., Abadi, N., Raab, H., Lewis, G. D., 1992. Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science* 256, 1205–1210.
- Hu, S., Sun, Y., Meng, Y., Wang, X., Yang, W., Fu, W., Guo, H., Qian, W., Hou, S., Li, B., Rao, Z., Lou, Z., Guo, Y., 2015. Molecular architecture of the ErbB2 extracellular domain homodimer. *Oncotarget* 6, 1695–1706.
- Hwang, B. J., Sternberg, P. W., 2004. A cell-specific enhancer that specifies *lin-3* expression in the *C. elegans* anchor cell for vulval development. *Development* 131, 143–151. doi:10.1242/dev.00924

- Inui, S., Higashiyama, S., Hashimoto, K., Higashiyama, M., Yoshikawa, K., Taniguchi, N., 1997. Possible role of coexpression of CD9 with membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor and amphiregulin in cultured human keratinocyte growth. *J. Cell. Physiol.* 171, 291–298. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199706)171:3<291::AID-JCP7>3.0.CO;2-J
- Islam, R., Wei, S.-Y., Chiu, W.-H., Hortsch, M., Hsu, J.-C., 2003. Neuroglial activates Echinoid to antagonize the *Drosophila* EGF receptor signaling pathway. *Development* 130, 2051–2059. doi:10.1242/dev.00415
- Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S., Mekada, E., 1998. A metalloprotease–disintegrin, MDC-9/meltrin- γ /ADAM-9 and PKC δ are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J.* 17, 7260–7272. doi:10.1093/emboj/17.24.7260
- Jiang, H.-S., Wu, Y.-C., 2014. LIN-3/EGF promotes the programmed cell death of specific cells in *Caenorhabditis elegans* by transcriptional activation of the pro-apoptotic gene *egl-1*. *PLoS Genet.* 10. doi:10.1371/journal.pgen.1004513
- Jones, J. T., Akita, R. W., Sliwkowski, M. X., 1999. Binding specificities and affinities of EGF domains for ErbB receptors. *FEBS Lett.* 447, 227–231. doi:10.1016/S0014-5793(99)00283-5
- Jongeward, G. D., Clandinin, T. R., Sternberg, P. W., 1995. Sli-1, a negative regulator of Let-23-mediated signaling in *C. elegans*. *Genetics* 139, 1553–1566.
- Jørgensen, P. E., Nexø, E., Poulsen, S. S., Almendingen, M., Berg, T., 1994. Processing of epidermal growth factor in the rat submandibular gland by kallikrein-like enzymes. *Growth Factors Chur Switz.* 11, 113–123.
- Jorissen, R. N., Epa, V. C., Treutlein, H. R., Garrett, T. P., Ward, C. W., Burgess, A. W., 2000. Characterization of a comparative model of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 9, 310–324.
- Kaech, S. M., Whitfield, C. W., Kim, S. K., 1998. The LIN-2/LIN-7/LIN-10 complex mediates basolateral membrane localization of the *C. elegans* EGF receptor Let-23 in vulval epithelial cells. *Cell* 94, 761–771.
- Kainulainen, V., Sundvall, M., Määttä, J. A., Santiestevan, E., Klagsbrun, M., Elenius, K., 2000. A natural ErbB4 isoform that does not activate phosphoinositide 3-kinase mediates proliferation but not survival or chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 275, 8641–8649. doi:10.1074/jbc.275.12.8641
- Katoh, M., Yazaki, Y., Sugimura, T., Terada, M., 1993. c-erbB3 gene encodes secreted as well as transmembrane receptor tyrosine kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 1189–1197. doi:10.1006/bbrc.1993.1542
- * Kholodenko, B. N., 2002. MAP kinase cascade signaling and endocytic trafficking: a marriage of convenience? *Trends Cell Biol.* 12, 173–177. doi:10.1016/S0962-8924(02)02251-1
- * Kim, S. K., 1997. Polarized signaling: basolateral receptor localization in epithelial cells by PDZ-containing proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 853–859. doi:10.1016/S0955-0674(97)80088-9
- Kimble, J., 1981. Alterations in cell lineage following laser ablation of cells in the somatic gonad of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 87, 286–300. doi:10.1016/0012-1606(81)90152-4
- Kimura, H., Sakai, K., Arao, T., Shimoyama, T., Tamura, T., Nishio, K., 2007. Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild-type or mutant epidermal growth factor receptor. *Cancer Sci.* 98, 1275–1280. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00510.x
- Klapper, L. N., Glathe, S., Vaisman, N., Hynes, N. E., Andrews, G. C., Sela, M., Yarden, Y., 1999. The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 4995–5000.
- Klein, D. E., Nappl, V. M., Shvartsman, S. Y., Lemmon, M. A., 2004. Argos inhibits epidermal growth factor receptor signalling by ligand sequestration. *Nature* 430, 1040–1044. doi:10.1038/nature02840
- Klein, D. E., Stayrook, S. E., Shi, F., Narayan, K., Lemmon, M. A., 2008. Structural basis for EGFR ligand sequestration by Argos. *Nature* 453, 1271–1275. doi:10.1038/nature06978
- Kochupurakkal, B. S., Harari, D., Di-Segni, A., Maik-Rachline, G., Lyass, L., Gur, G., Kerber, G., Citri, A., Lavi, S., Eilam, R., Chalifa-Caspi, V., Eshhar, Z., Pikarsky, E., Pinkas-Kramarski, R., Bacus, S. S., Yarden, Y., 2005. Epigen, the last ligand of ErbB receptors, reveals intricate relationships between affinity and mitogenicity. *J. Biol. Chem.* 280, 8503–8512. doi:10.1074/jbc.M413919200
- Komuro, A., Nagai, M., Navin, N. E., Sudol, M., 2003. WW domain-containing protein YAP associates with ErbB-4 and acts as a co-transcriptional activator for the carboxyl-terminal fragment of ErbB-4 that

- translocates to the nucleus. *J. Biol. Chem.* 278, 33334–33341. doi:10.1074/jbc.M305597200
- Korc, M., Finman, J. E., 1989. Attenuated processing of epidermal growth factor in the face of marked degradation of transforming growth factor- α . *J. Biol. Chem.* 264, 14990–14999.
- Kraus, M. H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N. C., Aaronson, S. A., 1989. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ErbB/Epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 9193–9197.
- Krause, M., Hirsh, D., 1987. A trans-spliced leader sequence on actin mRNA in *C. elegans*. *Cell* 49, 753–761. doi:10.1016/0092-8674(87)90613-1
- Lee, H., Akita, R. W., Sliwkowski, M. X., Maihle, N. J., 2001. A naturally occurring secreted human ErbB3 receptor isoform inhibits heregulin-stimulated activation of ErbB2, ErbB3, and ErbB4. *Cancer Res.* 61, 4467–4473.
- Lee, H., Maihle, N. J., 1998. Isolation and characterization of four alternate c-erbB3 transcripts expressed in ovarian carcinoma-derived cell lines and normal human tissues. *Oncogene* 16, 3243–3252. doi:10.1038/sj.onc.1201866
- Lee, J. R., Urban, S., Garvey, C. F., Freeman, M., 2001. Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in *Drosophila*. *Cell* 107, 161–171. doi:10.1016/S0092-8674(01)00526-8
- Leimeroth, R., Lobsiger, C., Lüssi, A., Taylor, V., Suter, U., Sommer, L., 2002. Membrane-bound neuregulin1 type III actively promotes schwann cell differentiation of multipotent progenitor cells. *Dev. Biol.* 246, 245–258. doi:10.1006/dbio.2002.0670
- Lemmens, K., Doggen, K., Keulenaer, G. W. D., 2007. Role of neuregulin 1/ErbB signaling in cardiovascular physiology and disease. *Circulation* 116, 954–960. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.690487
- Lesa, G. M., Sternberg, P. W., 1997. Positive and negative tissue-specific signaling by a nematode epidermal growth factor receptor. *Mol. Biol. Cell* 8, 779–793.
- * Levitzki, A., Gazit, A., 1995. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science* 267, 1782–1788.
- Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S. A., Katz, M., Tsygankov, A. Y., Alroy, I., Lavi, S., Iwai, K., Reiss, Y., Ciechanover, A., Lipkowitz, S., Yarden, Y., 1999. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol. Cell* 4, 1029–1040. doi:10.1016/S1097-2765(00)80231-2
- Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W. Y., Beguinot, L., Geiger, B., Yarden, Y., 1998. c-Cbl/Sli-1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev.* 12, 3663–3674.
- Li, L., Cleary, S., Mandarano, M. A., Long, W., Birchmeier, C., Jones, F. E., 2002. The breast proto-oncogene, HRG α regulates epithelial proliferation and lobuloalveolar development in the mouse mammary gland. *Oncogene* 21, 4900–4907. doi:10.1038/sj.onc.1205634
- Li, X., Maretzky, T., Weskamp, G., Monette, S., Qing, X., Issuree, P. D. A., Crawford, H. C., McIlwain, D. R., Mak, T. W., Salmon, J. E., Blobel, C. P., 2015. iRhoms 1 and 2 are essential upstream regulators of ADAM-17-dependent EGFR signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 6080–6085. doi:10.1073/pnas.1505649112
- Li, Z., Liu, S., Cai, Y., 2015. EGFR/MAPK signaling regulates the proliferation of *Drosophila* renal and nephric stem cells. *J. Genet. Genomics* 42, 9–20. doi:10.1016/j.jgg.2014.11.007
- Liao, H.-J., Carpenter, G., 2012. Regulated intramembrane cleavage of the EGF receptor. *Traffic Cph. Den.* 13, 1106–1112. doi:10.1111/j.1600-0854.2012.01371.x
- Liu, P. C. C., Liu, X., Li, Y., Covington, M., Wynn, R., Huber, R., Hillman, M., Yang, G., Ellis, D., Marando, C., Katiyar, K., Bradley, J., Abremski, K., Stow, M., Rupar, M., Zhuo, J., Li, Y.-L., Lin, Q., Burns, D., Xu, M., Zhang, C., Qian, D.-Q., He, C., Sharief, V., Weng, L., Agrios, C., Shi, E., Metcalf, B., Newton, R., Friedman, S., Yao, W., Scherle, P. A., Hollis, G., Burn, T. C., 2006. Identification of ADAM-10 as a major source of HER2 ectodomain sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* 5, 657–664. doi:10.4161/cbt.5.6.2708
- Livneh, E., Glazer, L., Segal, D., Schlessinger, J., Shilo, B.-Z., 1985. The *Drosophila* EGF receptor gene homolog: Conservation of both hormone binding and kinase domains. *Cell* 40, 599–607. doi:10.1016/0092-8674(85)90208-9

- Luetteke, N. C., Qiu, T. H., Fenton, S. E., Troyer, K. L., Riedel, R. F., Chang, A., Lee, D. C., 1999. Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. *Development* 126, 2739–2750.
- Maier, H., Meixner, M., Hartmann, D., Sandhoff, R., Wang-Eckhardt, L., Zöller, I., Gieselmann, V., Eckhardt, M., 2011. Normal fur development and sebum production depends on fatty acid 2-hydroxylase expression in sebaceous glands. *J. Biol. Chem.* 286, 25922–25934. doi:10.1074/jbc.M111.231977
- Maloof, J. N., Kenyon, C., 1998. The Hox gene *lin-39* is required during *C. elegans* vulval induction to select the outcome of Ras signaling. *Development* 125, 181–190.
- Mao, Y., Freeman, M., 2009. Fasciclin 2, the *Drosophila* orthologue of neural cell-adhesion molecule, inhibits EGF receptor signalling. *Dev. Camb. Engl.* 136, 473–481. doi:10.1242/dev.026054
- Maretzky, T., Evers, A., Zhou, W., Swendeman, S. L., Wong, P.-M., Rafii, S., Reiss, K., Blobel, C. P., 2011. Migration of FGF-7-stimulated epithelial cells and VEGF-A-stimulated HUVECs depends on EGFR transactivation by ADAM-17. *Nat. Commun.* 2, 229. doi:10.1038/ncomms1232
- Maretzky, T., McIlwain, D. R., Issuree, P. D. A., Li, X., Malapeira, J., Amin, S., Lang, P. A., Mak, T. W., Blobel, C. P., 2013. iRhom2 controls the substrate selectivity of stimulated ADAM17-dependent ectodomain shedding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 11433–11438. doi:10.1073/pnas.1302553110
- Margolis, B. L., Lax, I., Kris, R., Dombalagian, M., Honegger, A. M., Howk, R., Givol, D., Ullrich, A., Schlessinger, J., 1989. All autophosphorylation sites of epidermal growth factor (EGF) receptor and HER2/neu are located in their carboxyl-terminal tails. Identification of a novel site in EGF receptor. *J. Biol. Chem.* 264, 10667–10671.
- Marti, U., Burwen, S. J., Jones, A. L., 1989. Biological effects of epidermal growth factor, with emphasis on the gastrointestinal tract and liver: An update. *Hepatology* 9, 126–138. doi:10.1002/hep.1840090122
- Martin-Blanco, E., Roch, F., Noll, E., Baonza, A., Duffy, J. B., Perrimon, N., 1999. A temporal switch in DER signaling controls the specification and differentiation of veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development* 126, 5739–5747.
- Meyer, D., Birchmeier, C., 1995. Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* 378, 386–390. doi:10.1038/378386a0
- Mineev, K. S., Bocharov, E. V., Pustovalova, Y. E., Bocharova, O. V., Chupin, V. V., Arseniev, A. S., 2010. Spatial structure of the transmembrane domain heterodimer of ErbB1 and ErbB2 receptor tyrosine kinases. *J. Mol. Biol.* 400, 231–243. doi:10.1016/j.jmb.2010.05.016
- Mineo, C., James, G. L., Smart, E. J., Anderson, R. G. W., 1996. Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane. *J. Biol. Chem.* 271, 11930–11935. doi:10.1074/jbc.271.20.11930
- Montero, J. C., Yuste, L., Díaz-Rodríguez, E., Esparís-Ogando, A., Pandiella, A., 2000. Differential shedding of transmembrane neuregulin isoforms by the tumor necrosis factor- α -converting enzyme. *Mol. Cell. Neurosci.* 16, 631–648. doi:10.1006/mcne.2000.0896
- Musacchio, M., Perrimon, N., 1996. The *Drosophila kekkon* genes: novel members of both the leucine-rich repeat and immunoglobulin superfamilies expressed in the CNS. *Dev. Biol.* 178, 63–76. doi:10.1006/dbio.1996.0198
- Nagaraj, R., Pickup, A. T., Howes, R., Moses, K., Freeman, M., Banerjee, U., 1999. Role of the EGF receptor pathway in growth and patterning of the *Drosophila* wing through the regulation of *vestigial*. *Development* 126, 975–985.
- Nanney, L. B., Stoscheck, C. M., Magid, M., King, L. E., 1986. Altered [125I] epidermal growth factor binding and receptor distribution in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 86, 260–265. doi:10.1111/1523-1747.ep12285389
- Neelam, B., Richter, A., Chamberlin, S. G., Puddicombe, S. M., Wood, L., Murray, M. B., Nandagopal, K., Niyogi, S. K., Davies, D. E., 1998. Structure–function studies of ligand-induced epidermal growth factor receptor dimerization. *Biochemistry (Mosc.)* 37, 4884–4891. doi:10.1021/bi972548x
- Neuman-Silberberg, F. S., Schüpbach, T., 1996. The *Drosophila* TGF- α -like protein Gurken: expression and cellular localization during *Drosophila* oogenesis. *Mech. Dev.* 59, 105–113. doi:10.1016/0925-4773(96)00567-9
- Neuman-Silberberg, F. S., Schüpbach, T., 1993. The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF α -like protein. *Cell* 75, 165–174.

- Neve, R. M., Sutterlüty, H., Pullen, N., Lane, H. A., Daly, J. M., Krek, W., Hynes, N.E., 2000. Effects of oncogenic ErbB2 on G1 cell cycle regulators in breast tumour cells. *Oncogene* 19, 1647–1656. doi:10.1038/sj.onc.1203470
- Ni, C. Y., Murphy, M. P., Golde, T. E., Carpenter, G., 2001. γ -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* 294, 2179–2181. doi:10.1126/science.1065412
- Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J.-H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., Yokoyama, S., 2002. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 110, 775–787. doi:10.1016/S0092-8674(02)00963-7
- Olayioye, M. A., Beuvink, I., Horsch, K., Daly, J. M., Hynes, N. E., 1999. ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 274, 17209–17218. doi:10.1074/jbc.274.24.17209
- * Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A., Hynes, N. E., 2000. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 19, 3159–3167. doi:10.1093/emboj/19.13.3159
- Omenn, G. S., Guan, Y., Menon, R., 2014. A new class of protein cancer biomarker candidates: differentially-expressed splice variants of ErbB2 (HER2/neu) and ErbB1 (EGFR) in breast cancer cell lines. *J. Proteomics* 0, 103–112. doi:10.1016/j.jprot.2014.04.012
- Pai, L.-M., Barcelo, G., Schüpbach, T., 2000. D-cbl, a negative regulator of the egfr pathway, is required for dorsoventral patterning in *Drosophila* oogenesis. *Cell* 103, 51–61. doi:10.1016/S0092-8674(00)00104-5
- Pai, L.-M., Wang, P.-Y., Chen, S.-R., Barcelo, G., Chang, W.-L., Nilson, L., Schüpbach, T., 2006. Differential effects of Cbl isoforms on EGFR signaling in *Drosophila*. *Mech. Dev.* 123, 450–462. doi:10.1016/j.mod.2006.04.001
- Park, O. K., Schaefer, T. S., Nathans, D., 1996. *In vitro* activation of Stat3 by epidermal growth factor receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13704–13708.
- Peri, F., Bökel, C., Roth, S., 1999. Local Gurken signaling and dynamic MAPK activation during *Drosophila* oogenesis. *Mech. Dev.* 81, 75–88.
- Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., al, et, 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Sci. Wash.* 282, 1281–4.
- Petrelli, F., Borgonovo, K., Cabiddu, M., Ghilardi, M., Barni, S., 2011. Cetuximab and panitumumab in KRAS wild-type colorectal cancer: a meta-analysis. *Int. J. Colorectal Dis.* 26, 823–833. doi:10.1007/s00384-011-1149-0
- Pinkas-Kramarski, R., Soussan, L., Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I., Klapper, L., Lavi, S., Seger, R., Ratzkin, B. J., Sela, M., Yarden, Y., 1996. Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J.* 15, 2452–2467.
- Plowman, G. D., Culouscou, J. M., Whitney, G. S., Green, J. M., Carlton, G. W., Foy, L., Neubauer, M. G., Shoyab, M., 1993. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 1746–1750.
- Plowman, G. D., Green, J. M., Culouscou, J.-M., Carlton, G. W., Rothwell, V. M., Buckley, S., 1993. Heregulin induces tyrosine phosphorylation of HER4/p180erbB4. *Nature* 366, 473–475. doi:10.1038/366473a0
- Posner, I., Engel, M., Gazit, A., Levitzki, A., 1994. Kinetics of inhibition by tyrphostins of the tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor and analysis by a new computer program. *Mol. Pharmacol.* 45, 673–683.
- Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., Ullrich, A., 1999. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature* 402, 884–888. doi:10.1038/47260
- Price, J. V., Clifford, R. J., Schüpbach, T., 1989. The maternal ventralizing locus torpedo is allelic to faint little ball, an embryonic lethal, and encodes the *Drosophila* EGF receptor homolog. *Cell* 56, 1085–1092. doi:10.1016/0092-8674(89)90641-7
- Raab, G., Kover, K., Paria, B. C., Dey, S. K., Ezzell, R. M., Klagsbrun, M., 1996. Mouse preimplantation blastocysts adhere to cells expressing the transmembrane form of heparin-binding EGF-like growth factor. *Development* 122, 637–645.
- Rall, L. B., Scott, J., Bell, G. I., Crawford, R. J., Penschow, J. D., Niall, H. D., Coghlan, J. P., 1985. Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. *Nature* 313, 228–231.

- Raz, E., Shilo, B. Z., 1993. Establishment of ventral cell fates in the *Drosophila* embryonic ectoderm requires DER, the EGF receptor homolog. *Genes Dev.* 7, 1937–1948. doi:10.1101/gad.7.10.1937
- Reeves, G. T., Kalifa, R., Klein, D. E., Lemmon, M. A., Shvartsman, S.Y., 2005. Computational analysis of EGFR inhibition by Argos. *Dev. Biol.* 284, 523–535. doi:10.1016/j.ydbio.2005.05.013
- Reich, A., Shilo, B.-Z., 2002. Keren, a new ligand of the *Drosophila* epidermal growth factor receptor, undergoes two modes of cleavage. *EMBO J.* 21, 4287–4296. doi:10.1093/emboj/cdf439
- Reiter, J. L., Maihle, N. J., 2003. Characterization and expression of novel 60-kDa and 110-kDa EGFR isoforms in human placenta. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 995, 39–47. doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb03208.x
- Reiter, J. L., Maihle, N. J., 1996. A 1.8 kb alternative transcript from the human epidermal growth factor receptor gene encodes a truncated form of the receptor. *Nucleic Acids Res.* 24, 4050–4056.
- Reiter, J. L., Threadgill, D. W., Eley, G. D., Strunk, K. E., Danielsen, A. J., Schehl Sinclair, C., Pearsall, R. S., Green, P. J., Yee, D., Lampland, A. L., Balasubramaniam, S., Crossley, T. D., Magnuson, T. R., James, C. D., Maihle, N. J., 2001. Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. *Genomics* 71, 1–20. doi:10.1006/geno.2000.6341
- Riese, D. J., Bermingham, Y., van Raaij, T. M., Buckley, S., Plowman, G. D., Stern, D. F., 1996. Betacellulin activates the epidermal growth factor receptor and eErbB-4, and induces cellular response patterns distinct from those stimulated by epidermal growth factor or neuregulin β . *Oncogene* 12, 345–353.
- Rio, C., Buxbaum, J. D., Peschon, J. J., Corfas, G., 2000. Tumor necrosis factor- α -converting enzyme is required for cleavage of ErbB4/HER4. *J. Biol. Chem.* 275, 10379–10387. doi:10.1074/jbc.275.14.10379
- Roth, S., Shira Neuman-Silberberg, F., Barcelo, G., Schüpbach, T., 1995. Cornichon and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in *Drosophila*. *Cell* 81, 967–978. doi:10.1016/0092-8674(95)90016-0
- Rutledge, B. J., Zhang, K., Bier, E., Jan, Y. N., Perrimon, N., 1992. The *Drosophila spitz* gene encodes a putative EGF-like growth factor involved in dorsal-ventral axis formation and neurogenesis. *Genes Dev.* 6, 1503–1517. doi:10.1101/gad.6.8.1503
- Sahin, U., Blobel, C. P., 2007. Ectodomain shedding of the EGF-receptor ligand epigen is mediated by ADAM-17. *FEBS Lett.* 581, 41–44. doi:10.1016/j.febslet.2006.11.074
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.-M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P., Blobel, C. P., 2004. Distinct roles for ADAM-10 and ADAM-17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J. Cell Biol.* 164, 769–779. doi:10.1083/jcb.200307137
- Sakai, T., Koga, M., Ohshima, Y., 1996. Genomic structure and 5' regulatory regions of the *let-23* gene in the nematode *C. elegans*. *J. Mol. Biol.* 256, 548–555. doi:10.1006/jmbi.1996.0107
- Salvatori, L., Ravenna, L., Felli, M.P., Cardillo, M. R., Russo, M. A., Frati, L., Gulino, A., Petrangeli, E., 2000. Identification of an estrogen-mediated deoxyribonucleic acid-binding independent transactivation pathway on the epidermal growth factor receptor gene promoter. *Endocrinology* 141, 2266–2274. doi:10.1210/endo.141.6.7521
- Sanderson, M. P., Erickson, S. N., Gough, P. J., Garton, K. J., Wille, P. T., Raines, E. W., Dunbar, A. J., Dempsey, P. J., 2005. ADAM-10 mediates ectodomain shedding of the betacellulin precursor activated by p-aminophenylmercuric acetate and extracellular calcium influx. *J. Biol. Chem.* 280, 1826–1837. doi:10.1074/jbc.M408804200
- Sanderson, M. P., Keller, S., Alonso, A., Riedle, S., Dempsey, P. J., Altevogt, P., 2008. Generation of novel, secreted epidermal growth factor receptor (EGFR/ErbB1) isoforms via metalloprotease-dependent ectodomain shedding and exosome secretion. *J. Cell. Biochem.* 103, 1783–1797. doi:10.1002/jcb.21569
- Sandrock, A. W., Dryer, S. E., Rosen, K. M., Gozani, S. N., Kramer, R., Theill, L. E., Fischbach, G. D., 1997. Maintenance of acetylcholine receptor number by neuregulins at the neuromuscular junction *in vivo*. *Science* 276, 599–603.
- Sawyer, C., Hiles, I., Page, M., Crompton, M., Dean, C., 1998. Two *erbB-4* transcripts are expressed in normal breast and in most breast cancers. *Publ. Online* 18 August 1998 Doi101038sjonc1202015 17. doi:10.1038/sj.onc.1202015
- Schejter, E. D., Segal, D., Glazer, L., Shilo, B. Z., 1986. Alternative 5' exons and tissue-specific expression of the *Drosophila* EGF receptor homolog transcripts. *Cell* 46, 1091–1101.

- Schnepp, B., Donaldson, T., Grumblin, G., Ostrowski, S., Schweitzer, R., Shilo, B.-Z., Simcox, A., 1998. EGF domain swap converts a *Drosophila* EGF receptor activator into an inhibitor. *Genes Dev.* 12, 908–913.
- Schnepp, B., Grumblin, G., Donaldson, T., Simcox, A., 1996. Vein is a novel component in the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway with similarity to the neuregulins. *Genes Dev.* 10, 2302–2313. doi:10.1101/gad.10.18.2302
- Schweitzer, R., Shaharabany, M., Seger, R., Shilo, B. Z., 1995. Secreted Spitz triggers the DER signaling pathway and is a limiting component in embryonic ventral ectoderm determination. *Genes Dev.* 9, 1518–1529. doi:10.1101/gad.9.12.1518
- Scott, G. K., Robles, R., Park, J. W., Montgomery, P. A., Daniel, J., Holmes, W. E., Lee, J., Keller, G. A., Li, W. L., Fendly, B. M., 1993. A truncated intracellular HER2/neu receptor produced by alternative RNA processing affects growth of human carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2247–2257.
- Seno, M., Tada, H., Kosaka, M., Sasada, R., Igarashi, K., Shing, Y., Folkman, J., Ueda, M., Yamada, H., 1996. Human betacellulin, a member of the EGF family dominantly expressed in pancreas and small intestine, is fully active in a monomeric form. *Growth Factors Chur Switz.* 13, 181–191.
- * Seshacharyulu, P., Ponnusamy, M. P., Haridas, D., Jain, M., Ganti, A., Batra, S. K., 2012. Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* 16, 15–31. doi:10.1517/14728222.2011.648617
- Shelly, M., Pinkas-Kramarski, R., Guarino, B. C., Waterman, H., Wang, L.-M., Lyass, L., Alimandi, M., Kuo, A., Bacus, S. S., Pierce, J. H., Andrews, G. C., Yarden, Y., 1998. Epiregulin is a potent pan-ErbB ligand that preferentially activates heterodimeric receptor complexes. *J. Biol. Chem.* 273, 10496–10505. doi:10.1074/jbc.273.17.10496
- * Shilo, B.-Z., 2003. Signaling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway during development. *Exp. Cell Res.* 284, 140–149. doi:10.1016/S0014-4827(02)00094-0
- Shirakabe, K., Wakatsuki, S., Kurisaki, T., Fujisawa-Sehara, A., 2001. Roles of Meltrin beta /ADAM-19 in the processing of neuregulin. *J. Biol. Chem.* 276, 9352–9358. doi:10.1074/jbc.M007913200
- Shirakata, Y., Kimura, R., Nanba, D., Iwamoto, R., Tokumaru, S., Morimoto, C., Yokota, K., Nakamura, M., Sayama, K., Mekada, E., Higashiyama, S., Hashimoto, K., 2005. Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. *J. Cell Sci.* 118, 2363–2370. doi:10.1242/jcs.02346
- Shirakata, Y., Komurasaki, T., Toyoda, H., Hanakawa, Y., Yamasaki, K., Tokumaru, S., Sayama, K., Hashimoto, K., 2000. Epiregulin, a novel member of the epidermal growth factor family, is an autocrine growth factor in normal human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 275, 5748–5753.
- Shirogane, T., Fukada, T., Muller, J. M. M., Shima, D. T., Hibi, M., Hirano, T., 1999. Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity* 11, 709–719. doi:10.1016/S1074-7613(00)80145-4
- Shoyab, M., McDonald, V. L., Bradley, J. G., Todaro, G.J., 1988. Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 6528–6532.
- * Sibilia, M., Kroismayr, R., Lichtenberger, B. M., Natarajan, A., Hecking, M., Holcmann, M., 2007. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation* 75, 770–787. doi:10.1111/j.1432-0436.2007.00238.x
- Simske, J. S., Kaech, S. M., Harp, S. A., Kim, S. K., 1996. Let-23 receptor localization by the cell junction protein LIN-7 during *C. elegans* vulval induction. *Cell* 85, 195–204. doi:10.1016/S0092-8674(00)81096-X
- * Singh, B., Coffey, R. J., 2014. Trafficking of epidermal growth factor receptor ligands in polarized epithelial cells. *Annu. Rev. Physiol.* 76, 275–300. doi:10.1146/annurev-physiol-021113-170406
- Sinibaldi, D., Wharton, W., Turkson, J., Bowman, T., Pledger, W. J., Jove, R., 2000. Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. *Oncogene* 19, 5419–5427. doi:10.1038/sj.onc.1203947
- Sizemore, N., Cox, A. D., Barnard, J. A., Oldham, S. M., Reynolds, E. R., Der, C. J., Coffey, R. J., 1999. Pharmacological inhibition of Ras-transformed epithelial cell growth is linked to down-regulation of epidermal growth factor-related peptides. *Gastroenterology* 117, 567–576. doi:10.1016/S0016-5085(99)70449-X
- Skeath, J. B., 1998. The *Drosophila* EGF receptor controls the formation and specification of neuroblasts

- along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development* 125, 3301–3312.
- Skorobogata, O., Escobar-Restrepo, J. M., Rocheleau, C.E., 2014. An AGEF-1/Arf GTPase/AP-1 ensemble antagonizes Let-23 EGFR basolateral localization and signaling during *C. elegans* vulva induction. *PLoS Genet.* 10. doi:10.1371/journal.pgen.1004728
- Skorobogata, O., Meng, J., Gauthier, K., Rocheleau, C. E., 2016. Dynein-mediated trafficking negatively regulates Let-23 EGFR signaling. *Mol. Biol. Cell* 27, 3771–3779. doi:10.1091/mbc.E15-11-0757
- Skorobogata, O., Rocheleau, C.E., 2012. RAB-7 antagonizes Let-23 EGFR signaling during vulva development in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* 7. doi:10.1371/journal.pone.0036489
- Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., Norton, L., 2001. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 344, 783–792. doi:10.1056/NEJM200103153441101
- Sliwkowski, M. X., Lofgren, J. A., Lewis, G. D., Hotaling, T. E., Fendly, B. M., Fox, J. A., 1999. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin. Oncol.* 26, 60–70.
- Sliwkowski, M. X., Schaefer, G., Akita, R. W., Lofgren, J. A., Fitzpatrick, V. D., Nuijens, A., Fendly, B. M., Cerione, R. A., Vandlen, R. L., Carraway, K. L., 1994. Coexpression of ErbB2 and ErbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J. Biol. Chem.* 269, 14661–14665.
- Sorkin, A., Helin, K., Waters, C. M., Carpenter, G., Beguinot, L., 1992. Multiple autophosphorylation sites of the epidermal growth factor receptor are essential for receptor kinase activity and internalization. Contrasting significance of tyrosine 992 in the native and truncated receptors. *J. Biol. Chem.* 267, 8672–8678.
- Sorkin, A., Waters, C., Overholser, K. A., Carpenter, G., 1991. Multiple autophosphorylation site mutations of the epidermal growth factor receptor. Analysis of kinase activity and endocytosis. *J. Biol. Chem.* 266, 8355–8362.
- Spencer, S. A., Cagan, R. L., 2003. Echinoid is essential for regulation of EGFR signaling and R8 formation during *Drosophila* eye development. *Development* 130, 3725–3733. doi:10.1242/dev.00605
- * Sternberg, P. W., 2005. Vulval development. *WormBook*. doi:10.1895/wormbook.1.6.1
- Stetak, A., Hoier, E. F., Croce, A., Cassata, G., Di Fiore, P. P., Hajnal, A., 2006. Cell fate-specific regulation of EGF receptor trafficking during *Caenorhabditis elegans* vulval development. *EMBO J.* 25, 2347–2357. doi:10.1038/sj.emboj.7601137
- Strachan, L., Murison, J. G., Prestidge, R. L., Sleeman, M. A., Watson, J. D., Kumble, K. D., 2001. Cloning and biological activity of epigen, a novel member of the epidermal growth factor superfamily. *J. Biol. Chem.* 276, 18265–18271. doi:10.1074/jbc.M006935200
- Sunada, H., Magun, B. E., Mendelsohn, J., MacLeod, C. L., 1986. Monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor is internalized without stimulating receptor phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 3825–3829.
- Tan, P. B., Lackner, M. R., Kim, S. K., 1998. MAP kinase signaling specificity mediated by the LIN-1 Ets/LIN-31 WH transcription factor complex during *C. elegans* vulval induction. *Cell* 93, 569–580. doi:10.1016/S0092-8674(00)81186-1
- Taniguchi, K., Yamamoto, S., Aoki, S., Toda, S., Izuhara, K., Hamasaki, Y., 2011. Epigen is induced during the interleukin-13-stimulated cell proliferation in murine primary airway epithelial cells. *Exp. Lung Res.* 37, 461–470. doi:10.3109/01902148.2011.596894
- Toyoda, H., Komurasaki, T., Uchida, D., Morimoto, S., 1997. Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family. *Biochem. J.* 326, 69–75.
- Toyoda, H., Komurasaki, T., Uchida, D., Takayama, Y., (1), T.I., (1), T.O., Hanada, K., 1995. Epiregulin, a novel epidermal growth factor with mitogenic activity for rat primary hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 7495–7500. doi:10.1074/jbc.270.13.7495
- Traynor, K., 2012. FDA approves pertuzumab for breast cancer. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 69, 1178–1178. doi:10.2146/news120049
- Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunakaran, D., Lavi, S., Ratzkin, B. J., Yarden, Y., 1996. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5276–5287.
- Uehara, Y., Fukazawa, H., Murakami, Y., Mizuno, S., 1989. Irreversible inhibition of v-src tyrosine kinase activity by herbimycin a and its abrogation by sulfhydryl compounds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 803–809. doi:10.1016/0006-291X(89)92293-6

- Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Libermann, T. A., Schlessinger, J., 1984. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309, 418–425. doi:10.1038/309418a0
- Urban, S., Lee, J. R., Freeman, M., 2002. A family of rhomboid intramembrane proteases activates all *Drosophila* membrane-tethered EGF ligands. *EMBO J.* 21, 4277–4286. doi:10.1093/emboj/cdf434
- Urban, S., Lee, J. R., Freeman, M., 2001. *Drosophila* Rhomboid 1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell* 107, 173–182. doi:10.1016/S0092-8674(01)00525-6
- Vecchi, M., Baulida, J., Carpenter, G., 1996. selective cleavage of the heregulin receptor ErbB-4 by protein kinase C activation. *J. Biol. Chem.* 271, 18989–18995. doi:10.1074/jbc.271.31.18989
- Vermeer, P. D., Einwalter, L. A., Moninger, T. O., Rokhlina, T., Kern, J. A., Zabner, J., Welsh, M. J., 2003. Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. *Nature* 422, 322–326. doi:10.1038/nature01440
- Viglietto, G., Motti, M. L., Bruni, P., Melillo, R. M., D'Alessio, A., Califano, D., Vinci, F., Chiappetta, G., Tschlis, P., Bellacosa, A., Fusco, A., Santoro, M., 2002. Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat. Med.* 8, 1136–1144.
- Voutilainen, M., Lindfors, P. H., Lefebvre, S., Ahtiainen, L., Fliniaux, I., Rysti, E., Murtoniemi, M., Schneider, P., Schmidt-Ullrich, R., Mikkola, M. L., 2012. Ectodysplasin regulates hormone-independent mammary ductal morphogenesis via NF- κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5744–5749. doi:10.1073/pnas.1110627109
- Wang, J. Y., Miller, S. J., Falls, D. L., 2001. The N-terminal region of neuregulin isoforms determines the accumulation of cell surface and released neuregulin ectodomain. *J. Biol. Chem.* 276, 2841–2851. doi:10.1074/jbc.M005700200
- Wang, P.-Y., Pai, L.-M., 2011. D-Cbl binding to Drk leads to dose-dependent down-regulation of EGFR signaling and increases receptor-ligand endocytosis. *PLoS ONE* 6. doi:10.1371/journal.pone.0017097
- Wasserman, J. D., Urban, S., Freeman, M., 2000. A family of rhomboid-like genes: *Drosophila* Rhomboid 1 and Roughoid/Rhomboid 3 cooperate to activate EGF receptor signaling. *Genes Dev.* 14, 1651–1663.
- Waterman, H., Sabanai, I., Geiger, B., Yarden, Y., 1998. Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency. *J. Biol. Chem.* 273, 13819–13827. doi:10.1074/jbc.273.22.13819
- * Wells, A., 1999. EGF receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 637–643. doi:10.1016/S1357-2725(99)00015-1
- Wells, A., Gupta, K., Chang, P., Swindle, S., Glading, A., Shiraha, H., 1998. Epidermal growth factor receptor-mediated motility in fibroblasts. *Microsc. Res. Tech.* 43, 395–411. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19981201)43:5<395::AID-JEMT6>3.0.CO;2-T
- * Widakowich, C., Castro, G. de, Azambuja, E. de, Dinh, P., Awada, A., 2007. Review: Side effects of approved molecular targeted therapies in solid cancers. *The Oncologist* 12, 1443–1455. doi:10.1634/theoncologist.12-12-1443
- Wilken, J. A., Perez-Torres, M., Nieves-Alicea, R., Cora, E. M., Christensen, T. A., Baron, A. T., Maihle, N. J., 2013. Shedding of soluble epidermal growth factor receptor (sEGFR) is mediated by a metalloprotease/fibronectin/integrin axis and inhibited by cetuximab. *Biochemistry (Mosc.)* 52, 4531–4540. doi:10.1021/bi400437d
- Xu, W., Marcu, M., Yuan, X., Mimnaugh, E., Patterson, C., Neckers, L., 2002. Chaperone-dependent E3 ubiquitin ligase CHIP mediates a degradative pathway for c-ErbB2/Neu. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12847–12852. doi:10.1073/pnas.202365899
- Xu, Y. H., Richert, N., Ito, S., Merlino, G. T., Pastan, I., 1984. Characterization of epidermal growth factor receptor gene expression in malignant and normal human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 7308–7312.
- Yamamoto, T., Ikawa, S., Akiyama, T., Semba, K., Nomura, N., Miyajima, N., Saito, T., Toyoshima, K., 1986. Similarity of protein encoded by the human c-erbB2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 319, 230–234. doi:10.1038/319230a0
- Yamaoka, T., Frey, M. R., Dise, R. S., Bernard, J. K., Polk, D. B., 2011. Specific epidermal growth factor receptor autophosphorylation sites promote mouse colon epithelial cell chemotaxis and restitution.

- Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol. 301, G368–G376. doi:10.1152/ajpgi.00327.2010
- Yamauchi, T., Ueki, K., Tobe, K., Tamemoto, H., Sekine, N., Wada, M., Honjo, M., Takahashi, M., Takahashi, T., Hirai, H., Tushima, T., Akanuma, Y., Fujita, T., Komuro, I., Yazaki, Y., Kadowaki, T., 1997. Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone. *Nature* 390, 91–96. doi:10.1038/36369
- Yang, E., Lerner, L., Besser, D., Darnell, J. E., 2003. Independent and cooperative activation of chromosomal *c-fos* promoter by STAT3. *J. Biol. Chem.* 278, 15794–15799. doi:10.1074/jbc.M213073200
- Yarden, R. I., Wilson, M. A., Chrysogelos, S. A., 2001. Estrogen suppression of EGFR expression in breast cancer cells: A possible mechanism to modulate growth. *J. Cell. Biochem.* 81, 232–246. doi:10.1002/jcb.1142
- * Yarden, Y., Sliwkowski, M. X., 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127–137. doi:10.1038/35052073
- Yoon, C. H., Chang, C., Hopper, N. A., Lesa, G. M., Sternberg, P. W., 2000. Requirements of multiple domains of Sli-1, a *Caenorhabditis elegans* homologue of c-Cbl, and an inhibitory tyrosine in Let-23 in regulating vulval differentiation. *Mol. Biol. Cell* 11, 4019–4031. doi:10.1091/mbc.11.11.4019
- Yoshimaru, T., Komatsu, M., Miyoshi, Y., Honda, J., Sasa, M., Katagiri, T., 2015. Therapeutic advances in BIG3-PHB2 inhibition targeting the crosstalk between estrogen and growth factors in breast cancer. *Cancer Sci.* 106, 550–558. doi:10.1111/cas.12654
- Zabrecky, J. R., Lam, T., McKenzie, S. J., Carney, W., 1991. The extracellular domain of p185/neu is released from the surface of human breast carcinoma cells, SK-BR-3. *J. Biol. Chem.* 266, 1716–1720.
- Zak, N. B., Wides, R. J., Schejter, E. D., Raz, E., Shilo, B. Z., 1990. Localization of the DER/flb protein in embryos: implications on the faint little ball lethal phenotype. *Development* 109, 865–874.
- Zettl, M., Adrain, C., Strisovsky, K., Lastun, V., Freeman, M., 2011. Rhomboid family pseudoproteases use the ER quality control machinery to regulate intercellular signaling. *Cell* 145, 79–91. doi:10.1016/j.cell.2011.02.047
- Zhang, D., Sliwkowski, M. X., Mark, M., Frantz, G., Akita, R., Sun, Y., Hillan, K., Crowley, C., Brush, J., Godowski, P. J., 1997. Neuregulin 3 (NRG3): A novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 9562–9567.
- Zhang, Y., Yan, Z., Farooq, A., Liu, X., Lu, C., Zhou, M.-M., He, C., 2004. Molecular basis of distinct interactions between Dok1 PTB domain and tyrosine-phosphorylated EGF Receptor. *J. Mol. Biol.* 343, 1147–1155. doi:10.1016/j.jmb.2004.08.072
- Zhao, Y., Sawyer, D. R., Baliga, R. R., Opel, D. J., Han, X., Marchionni, M. A., Kelly, R. A., 1998. Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes persistence of ErbB2 and ErbB4 expression in neonatal and adult ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 10261–10269. doi:10.1074/jbc.273.17.10261
- Zhou, B. P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.-H., Hung, M.-C., 2001a. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat. Cell Biol.* 3, 245.
- Zhou, B. P., Liao, Y., Xia, W., Zou, Y., Spohn, B., Hung, M.-C., 2001b. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* 3, 973.
- Zhou, S., Shoelson, S. E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W. G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R. J., Neel, B. G., Birge, R. B., Fajardo, J. E., Chou, M. M., Hanafusa, H., Schaffhausen, B., Cantley, L. C., 1993. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72, 767–778. doi:10.1016/0092-8674(93)90404-E
- Zhu, X., Lai, C., Thomas, S., Burden, S. J., 1995. Neuregulin receptors, ErbB3 and ErbB4, are localized at neuromuscular synapses. *EMBO J.* 14, 5842–5848.